Kátia Maia Martins

Avaliação microbiológica e
epidemiológica de cepas do complexo
Burkholderia cepacia isoladas de
pacientes com fibrose cística

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Pediatria

Orientador: Dr. Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho

São Paulo

2007

Martins, KM. Avaliação microbiológica e epidemiológica de cepas do complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de pacientes com fibrose cística [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

Os objetivos deste estudo foram identificar o genomovar e a presença de fatores de virulência entre cepas do complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de pacientes com fibrose cística da nossa Unidade, através de reações de PCR que exploram diferenças no gene *recA*, e analisar as cepas através de genotipagem por RAPD, com fins epidemiológicos. A identificação do genomovar foi obtida em 32/41 cepas, sendo os mais prevalentes *B. cenocepacia* (G-III) e *B. multivorans* (G-II). O gene *cbIA* (codifica o *pili*) não foi identificado em nenhuma cepa, mas o gene *esmR* (marcador de uma cepa epidêmica) foi encontrado em 2 amostras (pacientes não relacionados). A genotipagem detectou 23 padrões distintos, sem identificar padrões idênticos entre pacientes diferentes, indicando a ausência de infecção cruzada entre os pacientes.

Martins, KM. Microbiological and epidemiological evaluation of *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from cystic fibrosis patients [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

The objective of this study was to identify genomovar status and virulence markers among *Burkholderia cepacia* complex isolates obtained from cystic fibrosis patients attending our Unit, using PCR reactions exploring *recA* gene differences, and genotype isolates by RAPD, with epidemiological purposes. The genomovar status was identified in 32/41 isolates and the most prevalent were *B. cenocepacia* (G-III) and *B. multivorans* (G-II). The identification of virulence markers resulted negative for *cbIA* gene (cable pilus) in all isolates, while *esmR* gene (epidemic strain marker) was found in two isolates (from unrelated patients). Genotyping revealed 23 distinct patterns and identical patterns were not identified among different patients, indicating that cross infection is unlikely among our patients.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Joaquim e Mariland,
meus maiores ídolos,
agradeço pelo amor inabalável que me deram,
pela admiração e confiança que sempre
depositaram em mim e
por tudo o que me ensinaram
ao longo da vida.

Ao meu esposo, Francisco,
pelo apoio incondicional para a realização dos
meus sonhos, pela confiança, pelo amor e
simplesmente por você existir na minha vida. Seu
incentivo à minha vida profissional foi
fundamental para a realização deste estudo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus avós, José e Fé, Manoel e Atlântica,
pelos exemplos de bondade e de amor à família
e à vida e pelo incentivo que sempre me deram.

(In memoriam)

Às minhas tias, Maria Elvira e Marilza, pelos
exemplos de coragem e força de vontade para
superar quaisquer obstáculos por maiores que
sejam. Por tudo que sempre fizeram por mim,
por todos os ensinamentos e pelo amor e
dedicação que vocês sempre demonstraram.

À minha irmã, Érika, eterna amiga, que sempre
esteve ao meu lado, principalmente nos
momentos mais difíceis e que soube
compreender minhas ausências.
Exemplo de perseverança e determinação, que
tanto me orgulha com suas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Luiz Vicente R. F. da Silva Filho, primeiramente por ter me aceito como pós-graduanda, por estar sempre presente e disponível, pelo apoio à minha vida pessoal e profissional, pela confiança e pela paciência, em esperar o tempo necessário para que todos os obstáculos fossem contornados. Você é referência para minha vida, não só pela competência e conhecimento científico, como também pela pessoa que você é, exemplo de força e determinação. Espero que esta realização seja o marco da nossa grande amizade. Este mérito também é seu!

Agradeço ao Dr. Joaquim Carlos Rodrigues, chefe e responsável pela Unidade de Pneumologia Pediátrica do Instituto da Criança “Prof. Pedro de Alcântara”, por me proporcionar os primeiros passos dentro da Pneumologia, pelo apoio dado em minha carreira profissional, por acreditar e confiar em mim, a ponto de entregar seus pacientes aos meus cuidados quando precisava se ausentar. Você é um médico brilhante, um professor dedicado, uma das pessoas que mais admiro. Agradeço a Deus pela oportunidade de conviver com você!

Agradeço à Doroti de Oliveira Garcia e à Ana Carolina Azzuz Chernishev, da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, por toda a colaboração na realização das identificações bacterianas, pelas valiosas contribuições e

discussões e pela parceria na realização deste e, com certeza, de muitos outros estudos.

Agradeço ao Dr. Cláudio Sérgio Pannuti, chefe do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pela confiança e pela oportunidade de trabalhar em tão seletivo espaço.

Agradeço à Adriana Fumie Tateno, biomédica e companheira de trabalho no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por toda a colaboração na realização das reações, pelos ensinamentos de Biologia Molecular e pela sua disposição em sempre me ajudar. Seu auxílio foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Agradeço ao amigo André Broggin Dutra Rodrigues, aluno da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela ajuda na realização das extrações de DNA e das reações de PCR.

Agradeço a todos os outros colegas do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelas valiosas ajudas nos procedimentos.

Agradeço à minha amiga, Dra. Giuliana de Freitas Fongaro, pela colaboração na realização das coletas de amostras no Ambulatório, no transporte até o Instituto Adolfo Lutz e, principalmente, pelo apoio e disposição em sempre me

ajudar. Você sabe que seu auxílio foi muito importante para a realização deste estudo.

Agradeço à Dra. Joselina M. Andrade Cardieri, assistente da Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança “Prof. Pedro de Alcântara”, pela ajuda nas correções ortográficas desta dissertação e, principalmente, por sua amizade e companheirismo.

Agradeço às demais assistentes da Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança “Prof. Pedro de Alcântara”, pela amizade e carinho sempre incentivadores.

Agradeço ao Prof. Dr. Cláudio Leone, pelo auxílio na análise estatística.

Agradeço às funcionárias da Biblioteca do Instituto da Criança “Prof. Pedro de Alcântara”, em especial à Mariza Umetsu, que sempre foram muito prestativas.

Agradeço ao Nivaldo Lira Rocha e à Milene Aparecida Ribeiro Rocha, do setor de xerox do Instituto da Criança “Prof. Pedro de Alcântara”, por toda a colaboração na realização de cópias xerográficas e impressão do presente trabalho, sempre com bom humor, entusiasmo e disposição.

Agradeço à FAPESP, pelo suporte financeiro ao trabalho.

Agradeço à CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior), pelo apoio financeiro, de fundamental importância para a execução da pesquisa.

Agradeço a todos os pacientes portadores de fibrose cística, bem como aos seus familiares, cuja força e coragem para lutar frente a todo sofrimento da doença me fortalecem para seguir pesquisando e aprimorando meus conhecimentos; assisti-los como médica é um prazer, mas também uma grande responsabilidade. Espero ter oferecido mais que saber, uma palavra de alento, um gesto amigo e a gratidão.

E, finalmente, agradeço aos meus amigos e todos aqueles que contribuíram para a concretização deste estudo.

“As pessoas entram em nossas vidas
por acaso, mas não é por acaso que
elas permanecem”

Dostoyevsky

“Aprender é a única coisa de que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo e nunca
se arrepende”

Leonardo da Vinci

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de siglas

Lista de tabelas

Lista de quadros

Lista de figuras

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	15
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	17
3.1. Pacientes	18
3.2. Amostras	19
3.3. Cultura e identificação bacterianas	20
3.4. Extração e quantificação do DNA	22
3.5. Determinação dos genômovares	22
3.6. Pesquisa dos marcadores de virulência	25
3.7. Estudo epidemiológico molecular (RAPD)	27
3.8. Análise estatística	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Determinação dos genômovares	29

4.2. Pesquisa dos marcadores de virulência	35
4.3. Estudo epidemiológico molecular	36
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	51
7. ANEXOS	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE ABREVIATURAS

BCESM	<i>B. cepacia epidemic strain marker</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Ed.	Edição
Et al.	E outros
FC	Fibrose cística
GNI	Cartões para bactérias gram negativas
GPI	Cartões para bactérias gram positivas
IMC	Índice de massa corpórea
p.	Página
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
Prof.	Professor
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
VEF1	Volume Expiratório Forçado no 1º segundo

LISTA DE SIGLAS

FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
ICr	Instituto da Criança “Prof. Pedro de Alcântara”
IMT	Instituto de Medicina Tropical

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Cepas do complexo <i>B. cepacia</i> isoladas nos dois períodos do estudo	29
---	----

TABELA 2 - Resultados da caracterização de genomovar, seqüenciamento do gene <i>recA</i> e genotipagem por RAPD de cepas isoladas dos pacientes com fibrose cística e fenotipicamente identificadas como membros do complexo <i>B. cepacia</i> durante o estudo	33
---	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Complexo *Burkholderia cepacia*: genomovares e nomes das espécies correspondentes 06

QUADRO 2 - Painel de cepas típicas (*type strains*) e de origem conhecida utilizadas durante o estudo..... 21

QUADRO 3 - Características dos *primers* utilizados durante o estudo..... 26

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Imagens de corridas eletroforéticas em gel de agarose (genomovares)	30
FIGURA 2 - Imagem de corridas eletroforéticas em gel de agarose (gene <i>recA</i>)	32
FIGURA 3 - Imagens de corridas eletroforéticas em gel de agarose (marcadores de virulência: genes <i>cblA</i> e <i>esmR</i>)	35
FIGURA 4 – Genotipagem por RAPD de cepas do complexo <i>B. cepacia</i> isoladas de pacientes com fibrose cística, utilizando o <i>primer</i> 272, e visualizada em gel de acrilamida a 7,5% corado com nitrato de prata (0,2%)	37

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Distribuição dos genomovares encontrados nos pacientes com fibrose cística	32
---	----

RESUMO

RESUMO

Martins, KM. Avaliação microbiológica e epidemiológica de cepas do complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de pacientes com fibrose cística [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 80 p.

Introdução: Patógenos emergentes são isolados nas vias respiratórias de pacientes com fibrose cística (FC), entre eles a *Burkholderia cepacia*. Atualmente, é conhecida como um conjunto de nove espécies relacionadas (“genomovares”), referidas coletivamente como complexo *B. cepacia*. A identificação fenotípica do complexo *B. cepacia* é difícil, e métodos de análise do genoma bacteriano, como a reação em cadeia da polimerase, que exploram diferenças no gene *recA*, têm mostrado grande eficácia na caracterização dos genomovares. Alguns Centros de tratamento de FC demonstraram infecções cruzadas entre os pacientes e marcadores de virulência foram identificados com frequência em alguns deles. Métodos baseados em biologia molecular são capazes de realizar a genotipagem das cepas e têm sido utilizados na avaliação epidemiológica. **Objetivos:** Identificar o genomovar e a presença de marcadores de virulência entre as cepas do complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de pacientes com fibrose cística atendidos no ICr e analisar as cepas do complexo *Burkholderia cepacia* através de genotipagem pela técnica de RAPD. **Métodos:** Foram coletadas 672 amostras de escarro e esfregaço de

orofaringe de 140 pacientes com fibrose cística (6 meses a 19 anos) atendidos na nossa Unidade nos períodos de set/2000 a abr/2001 e jun/2003 a jun/2004. As amostras foram cultivadas em meios seletivos, incluindo meio para *B. cepacia*, e a identificação realizada por sistema automatizado (1º período) e por testes fenotípicos clássicos (2º período). Após a extração do DNA, as cepas foram submetidas a uma série de reações de PCR para a determinação dos genomovares (I a VII), utilizando *primers* direcionados à amplificação de diferentes trechos da sequência do gene *recA*, sendo, em seguida, submetidas ao seqüenciamento do DNA deste gene. Os genes de virulência pesquisados foram o *cbIA* (que codifica o *pili*) e o *esmR* (marcador de uma cepa epidêmica). A genotipagem foi realizada pela técnica do RAPD, que analisa todo o genoma bacteriano. **Resultados:** Foram isoladas 41 cepas do complexo *B. cepacia*, obtidas de 21 pacientes com fibrose cística. O método de PCR identificou o genomovar de 32/41 (78%) das cepas e todos os resultados foram confirmados através do seqüenciamento do DNA. *B. cenocepacia* foi o genomovar mais prevalente (n=17), seguido da *B. multivorans* (n=12), *B. vietnamiensis* (n=2) e *B. cepacia* (n=1). As nove cepas não caracterizadas foram submetidas ao seqüenciamento, tendo sido encontradas 5 cepas de *B. gladioli*, 2 cepas de *X. campestris* e 2 cepas permaneceram sem identificação. O gene *cbIA* não foi identificado em nenhuma cepa, mas o gene *esmR* foi encontrado em 2 amostras (pacientes não relacionados). A genotipagem detectou 23 padrões distintos, sem identificar padrões idênticos entre pacientes diferentes. **Conclusões:** O método de PCR baseado na amplificação do gene *recA*

mostrou ser eficaz para a determinação do genótipo. *B. cenocepacia* e *B. multivorans* foram as espécies mais prevalentes entre nossos pacientes. A prevalência de marcadores de virulência foi baixa entre as cepas isoladas. Infecção cruzada pelo complexo *B. cepacia* não parece ter ocorrido na nossa Unidade durante os períodos estudados.

Descritores: complexo *Burkholderia cepacia*, fibrose cística, fatores de virulência, epidemiologia molecular.

SUMMARY

SUMMARY

Martins, KM. Microbiologic and epidemiologic evaluation of *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from cystic fibrosis patients [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 80 p.

Introduction: Emerging pathogens are found in the respiratory tract of the cystic fibrosis (CF) patients, including the bacterium *Burkholderia cepacia*. At the present moment, it is recognized as a group of nine related species (“genomovars”), collectively referred as *B. cepacia* complex. Phenotypical identification of *B. cepacia* complex is difficult, and molecular based methods such as PCR, exploring differences in *recA* gene sequence, showed high efficacy for genomovar determination. *B. cepacia* complex cross infections among CF patients were previously described in some CF treatment Centers, and virulence markers were identified in a high frequency in some of them. Molecular based methods are suitable for strain genotyping and have been used for epidemiological evaluation. **Aims:** To identify genomovar status and virulence markers among *Burkholderia cepacia* complex isolates obtained from cystic fibrosis patients attending in the ICr, and to analyze the isolates through genotyping by RAPD. **Methods:** 672 sputum or oropharyngeal samples were obtained from 140 cystic fibrosis patients (6 months to 19 years) attending our Unit from sep/2000 to apr/2001 and jun/2003 to jun/2004. The samples were

cultivated in selective media, including *B. cepacia* medium, and bacterial identification obtained by automated system (first period) and by classical phenotypic tests (second period). After DNA extraction, *B. cepacia* complex strains were submitted to sequential PCR reactions targeting *recA* gene in order to determine genomovar status (I to VII), and after that, submitted to automated DNA sequencing of this gene. Virulence genes screened were *cbIA* (cable pilus) and *esmR* (epidemic strain marker). Genotyping was performed by whole bacterial genome fingerprinting using RAPD. **Results:** 41 isolates of *B. cepacia* complex were obtained from 21 cystic fibrosis patients. The PCR method identified genomovar status of 32/41 (78%) isolates and all results were confirmed by DNA sequencing. *B. cenocepacia* was the main genomovar (n=17), followed by *B. multivorans* (n=12), *B. vietnamiensis* (n=2) and *B. cepacia* (n=1). The nine isolates uncharacterized were submitted to sequencing and we found 5 isolates as *B. gladioli*, 2 isolates as *X. campestris* and 2 isolates remained unidentified. The *cbIA* gene was not identified in all isolates, but *esmR* gene was found on 2 strains (unrelated patients). Genotyping depicted 23 patterns, without identical patterns among different patients. **Conclusions:** The PCR method targeting *recA* gene showed to be a valuable tool for determination of genomovar status. *B. cenocepacia* and *B. multivorans* were the most prevalent species among our patients. The prevalence of virulence markers was low among the isolates. Cross infection by *B. cepacia* complex does not seem to have occurred in our Unit during the two studied periods.

Descriptors: *Burkholderia cepacia* complex, cystic fibrosis, virulence factors, molecular epidemiology.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO:

A fibrose cística é uma doença genética grave, de herança autossômica recessiva, considerada a doença genética letal mais freqüente na raça branca (Zielenski et al., 1995; Rosenstein et al., 1998). Representa uma das principais causas de doença pulmonar crônica na faixa etária pediátrica e afeta entre 1/2.000 e 1/4.500 das crianças de origem caucasiana. No Brasil, sua incidência situa-se entre 1/10.000 e 1/26.000 dos nascidos vivos (Raskin et al., 1993).

A fibrose cística é causada por mutações num gene situado no braço longo do cromossomo sete, que codifica uma proteína de 1480 aminoácidos denominada CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), cuja função principal é o transporte de íons cloro na superfície apical das células epiteliais do pâncreas e dos tratos respiratório, gastrointestinal, hepatobiliar e reprodutivo. Já foram identificadas mais de mil mutações neste gene, mas a deleção da fenilalanina na posição 508 (delta F508) é a mais comum (Ratjen et al., 2003; Rowe et al., 2005).

A redução do transporte de cloro é acompanhada da redução do transporte de sódio e água, o que resulta em desidratação e aumento da viscosidade das secreções. Isto está associado à obstrução luminal e à destruição de vários ductos exócrinos (Ramsey, 1996).

A doença caracteriza-se por uma alteração nas secreções das glândulas exócrinas de todo o organismo. Manifesta-se classicamente por doença pulmonar obstrutiva crônica progressiva, insuficiência pancreática

exócrina e desnutrição, além de níveis elevados de cloro no suor (Rosenstein et al., 1998).

Os indivíduos com fibrose cística nascem com os pulmões normais. O aparecimento de tosse e o acúmulo de secreção pulmonar podem ocorrer precocemente, habitualmente desencadeados por infecções virais. Em seguida, observa-se colonização do trato respiratório por patógenos peculiares como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa*, com posterior aparecimento de alterações inflamatórias na árvore traqueobrônquica dos pacientes. A infecção crônica do trato respiratório inferior é responsável pela grande morbidade e mortalidade da fibrose cística e as alterações levam à formação de bronquiectasias e destruição pulmonar, culminando com insuficiência respiratória crônica, “cor pulmonale” e óbito (Ramsey, 1996).

A importância das infecções pulmonares e o impacto das mesmas no prognóstico e na qualidade de vida dos pacientes portadores de fibrose cística motivam um grande cuidado na avaliação periódica da colonização bacteriana do trato respiratório destes indivíduos, que constitui um dos aspectos fundamentais do seguimento (Ramsey, 1996).

O patógeno de maior prevalência nesses pacientes é a *P. aeruginosa*, que coloniza cerca de 80% dos adultos (*Cystic Fibrosis Foudation Patient Registry*, 2004). Seu aparecimento nas vias aéreas de crianças de baixa idade é um fator de mau prognóstico, especialmente naquelas menores de dois anos de idade (Hudson et al., 1993). Estratégias de intervenção terapêutica precoce vêm sendo utilizadas no sentido de

reverter esta tendência ou postergar a colonização crônica por *P. aeruginosa* (Valerius et al., 1991; Vazquez et al., 1993; Frederiksen et al., 1997; Nixon et al., 2001).

Com a melhora da sobrevida destes pacientes nas últimas décadas, patógenos emergentes, como *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans*, têm sido detectados na via respiratória dos pacientes com fibrose cística.

A *Burkholderia cepacia* foi primeiramente descrita como causadora do apodrecimento de cebolas, em 1949, por Walter H. Burkholder. A *B. cepacia* é um bacilo gram negativo, aeróbio e resistente a diversos agentes antimicrobianos. Era formalmente conhecida como *Pseudomonas cepacia*, mas foi transferida para o novo gênero, denominado *Burkholderia*, por Yabuuchi em 1992 (Yabuuchi et al., 1992; Govan et al., 1996; Burns et al., 1999).

Atualmente, a *B. cepacia* é tida como uma das mais importantes bactérias invasoras e colonizadoras dos pulmões dos pacientes com fibrose cística. No início da década de 80, ela foi reconhecida como patógeno oportunista (Isles et al., 1984), a partir de casos graves de sepse, especialmente em adolescentes do sexo feminino (Síndrome da *cepacia*). Esta síndrome, que pode acometer até 20% dos pacientes, caracteriza-se por uma pneumonia necrotizante com febre, bacteremia, elevação da velocidade de hemossedimentação e leucocitose, que culminavam numa rápida e fatal deterioração clínica. Além desta evolução fulminante, reconheceram-se também outras duas síndromes clínicas:

infecção/colonização sem mudança na velocidade de declínio da função pulmonar e infecção com deterioração lenta da função pulmonar (esta forma acomete a maior parte dos pacientes) (Rosenstein et al., 1980; Govan et al., 1996; Bauernfeind et al., 1999; Burns et al., 1999; Coenye et al., 2001b).

Esta bactéria, que foi previamente identificada como meramente *B. cepacia*, é agora conhecida como um conjunto de nove espécies relacionadas, referidas coletivamente como complexo *B. cepacia*. Estas espécies são também denominadas de “genomovares” (Vandamme et al., 1997) e são diferenciadas entre si por peculiaridades na seqüência do DNA genômico (LiPuma et al., 1999; Mahenthiralingan et al., 2000; Whitby et al., 2000; Moore et al., 2001) ou na caracterização fenotípica (McMenamin et al., 2000; Henry et al., 2001). O termo genomovar é comumente usado para denominar espécies que são filogeneticamente distintas umas das outras, mas que são fenotipicamente indistinguíveis, quando realizados testes bioquímicos rotineiros dos laboratórios de microbiologia. São reconhecidas as espécies *B. cepacia* (genomovar I), *B. multivorans* (genomovar II), *B. cenocepacia* (genomovar III), *B. stabilis* (genomovar IV), *B. vietnamensis* (genomovar V), *B. dolosa* (genomovar VI), *B. ambifaria* (genomovar VII), *B. anthina* (genomovar VIII) e *B. pyrrocinia* (genomovar IX) como componentes do complexo *B. cepacia* (QUADRO 1) (Coenye et al., 2001a; Vandamme et al., 2002; Vermis et al., 2002; Vermis et al., 2004; LiPuma et al., 2005). Recentemente, foi descrito um novo membro deste complexo: *B. ubonensis* (Coenye et al., 2003; LiPuma, 2005). O gênero *Burkholderia* inclui ainda mais 21 espécies, além destas pertencentes ao complexo, sendo que

algumas são apenas patógenos de plantas (Coeney et al., 2001b; Coenye et al., 2003).

QUADRO 1. Complexo *Burkholderia cepacia*: genomovares e nomes das espécies correspondentes.

GENOMOVAR	NOME DA ESPÉCIE
Genomovar I	<i>B. cepacia</i>
Genomovar II	<i>B. multivorans</i>
Genomovar III	<i>B. cenocepacia</i>
Genomovar IV	<i>B. stabilis</i>
Genomovar V	<i>B. vietnamiensis</i>
Genomovar VI	<i>B. dolosa</i>
Genomovar VII	<i>B. ambifaria</i>
Genomovar VIII	<i>B. anthina</i>
Genomovar IX	<i>B. pyrrocinia</i>

Comparado com a *P. aeruginosa*, o complexo *B. cepacia* infecta somente uma pequena proporção dos pacientes com fibrose cística, mas têm um significativo impacto na sobrevida (Coenye et al., 2003). Sua prevalência varia bastante entre os centros especializados, o que pode ser consequência da metodologia de processamento das amostras nos laboratórios de microbiologia (Shreve et al., 1999; Coeney et al., 2001b; Silva Filho et al., 2002). Observa-se uma prevalência de até 10% na maioria dos centros, mas esta pode atingir até 40% dos pacientes em alguns locais de referência no tratamento da fibrose cística (Govan et al., 1996; Johansen

et al., 1998; Agodi et al., 2001).

Quando coloniza o trato respiratório de pacientes com fibrose cística, o complexo *B. cepacia* é capaz de invadir o epitélio e sobreviver dentro de células epiteliais e de macrófagos e, por isso, raramente é erradicado (Martin et al., 2000). Neste estudo, os autores demonstraram que as cepas do complexo *B. cepacia* encontradas no ambiente têm comportamento diferente daquelas isoladas no trato respiratório dos pacientes com fibrose cística, onde as primeiras são capazes de invadir os macrófagos e células epiteliais, mas não de sobreviverem ou replicarem no meio intracelular (Martin et al., 2000).

A resistência inerente destas espécies a boa parte dos antimicrobianos disponíveis (Govan et al., 1996), que impede muitas vezes a erradicação, e a dificuldade da identificação em laboratórios de microbiologia (van Pelt et al., 1999; McMenamin et al., 2000; Henry et al., 2001; Brisse et al., 2002; Silva Filho et al., 2002) contribuem para a complexidade da situação atual nos centros especializados no tratamento da fibrose cística.

A identificação fenotípica do complexo *B. cepacia* é difícil, e erros de identificação são freqüentemente relatados (van Pelt et al., 1999). McMenamin et al. publicaram, em 2000, um estudo onde foram avaliados diversos centros norte-americanos de tratamento de pacientes com fibrose cística e observaram que 36% das cepas identificadas como outras espécies bacterianas eram, de fato, membros do complexo *B. cepacia*. Além disso, 11% das cepas consideradas do complexo *B. cepacia*, eram em

sua maioria *B. gladioli*. Assim, como os métodos fenotípicos são habitualmente inadequados para a caracterização dos genomovares, os métodos de análise do genoma bacteriano vêm assumindo importância capital para este fim. Os mais utilizados são a análise das proteínas da célula por eletroforese (*whole-cell protein electrophoresis*) e do polimorfismo de fragmentos após digestão do DNA com enzimas de restrição (*RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Vermis et al., 2002).

Mais recentemente, métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* que exploram diferenças na sequência dos genes 16S e 23S *rRNA* (Bauernfeind et al., 1999; LiPuma et al., 1999; Whitby et al., 2000) e *recA* (Mahenthiralingam et al., 2000; Vermis et al., 2002) do complexo *B. cepacia* mostraram-se eficazes e rápidos para a caracterização dos genomovares. A análise do gene *recA* é capaz de discriminar quase todos os genomovares, já que ainda não existem *primers* descritos para os genomovares VIII e IX.

Sabe-se que todos os genomovares são potencialmente capazes de causar infecção em seres humanos. Entretanto, existe uma grande desproporcionalidade, com maior frequência de isolamentos das espécies *B. multivorans* e *B. cenocepacia*, em contraste com as espécies *B. anthina*, *B. stabilis* e *B. ambifaria*, que raramente são isoladas (Campana et al., 2005).

O genomovar mais prevalente nos pacientes com fibrose cística é a *B. cenocepacia*, causador de mais de 50% das infecções, seguido da *B. multivorans* (Mahenthiralingam et al., 2002). A infecção pela *B. cenocepacia*

está associada à maior mortalidade entre os pacientes com fibrose cística, quando comparada às infecções por *P. aeruginosa* e *B. multivorans*, e também é a espécie mais freqüentemente relacionada à Síndrome da *cepacia* (Vandamme et al., 2002; Courtney et al., 2004; Jones et al., 2004).

Apesar de tradicionalmente se considerar que uma vez infectado o paciente estará sempre infectado pelo complexo *B. cepacia*, alguns pacientes (5 a 10%) apresentam uma infecção transitória pelo complexo *B. cepacia*. A infecção é considerada transitória se ao menos três culturas consecutivas não identificarem o organismo por um período mínimo de 12 meses. Alguns estudos preliminares sugerem que o genômico poderia estar envolvido, de tal forma que a *B. multivorans* estaria mais freqüentemente relacionada a infecções transitórias, mas ainda são necessários novos estudos longitudinais para confirmar este achado (Jones et al., 2004; LiPuma, 2005; Mahenthiralingam et al., 2002).

Em alguns centros de tratamento destes pacientes, a infecção pelo complexo *B. cepacia* é considerada contra-indicação para a realização de transplante pulmonar, devido à alta taxa de mortalidade precoce observada no pós-operatório (Aris et al., 2001; Chaparro et al., 2001). Entretanto, Aris et al. (2001) demonstraram que apenas a infecção pela *B. cenocepacia* estaria relacionada ao aumento da mortalidade no pós-transplante.

As cepas do complexo *B. cepacia* podem ser transmitidas de forma indireta e direta entre os pacientes, através de contágio interpessoal (Govan et al., 1993; Smith et al., 1993; Pegues et al., 1995; Saiman et al., 2004). Em 1994, Pegues et al. publicaram um estudo realizado em três

acampamentos de verão nos Estados Unidos, onde eram recebidos pacientes com fibrose cística, com e sem infecção pelo complexo *B. cepacia*. Observou-se que 11 pacientes adquiriram a infecção nos acampamentos, possivelmente por transmissão pessoa a pessoa. Estudos posteriores realizados em outros países também associaram a transmissão ao contato social intenso e, com isso, os acampamentos foram abandonados em todo o mundo. Além disso, a aquisição da infecção pelo complexo *B. cepacia* está associada a outros fatores como hospitalização recente, lavagem inadequada das mãos e contaminação de aparelhos respiratórios (Saiman et al., 2004). Por isso, alguns centros vêm adotando políticas de segregação entre os pacientes infectados pelo complexo *B. cepacia* e têm conseguido significativa redução da taxa de incidência desta infecção (Walters et al., 1993).

Supõe-se ainda que algumas cepas seriam mais transmissíveis que outras, e dois genes têm sido utilizados como marcadores de uma linhagem epidêmica do complexo *B. cepacia*: os genes *cbIA* (que codifica o *pili* do complexo *B. cepacia*) e *esmR* (que codifica uma proteína reguladora de função ainda não completamente estabelecida; é também conhecido como *B. cepacia epidemic strain marker* – BCESM) (Mahenthiralingam et al., 1997; McDowell et al., 2004). Segundo Sajjan et al. (1995), o *pili* de cepas do complexo *B. cepacia* isoladas de pacientes com fibrose cística atua na aderência da bactéria às glicoproteínas do muco e também aumenta sua adesão às células epiteliais. Apesar de serem mais frequentemente identificados em cepas de *B. cenocepacia*, eles não são exclusivos deste

genomovar e não devem ser considerados marcadores absolutos de virulência ou de transmissibilidade (McDowell et al., 2004; Saiman et al., 2004).

A vigilância epidemiológica das infecções respiratórias por cepas do complexo *B. cepacia* é de fundamental importância para os centros de tratamento de pacientes com fibrose cística, devendo ser idealmente realizada de forma rotineira (Shreve et al., 1999). Neste sentido, a determinação do tipo de genomovar bem como o estudo da origem clonal das cepas isoladas são os aspectos mais relevantes, e visam investigar a transmissão entre pacientes. Os métodos de biologia molecular ocupam posição de destaque entre as técnicas utilizadas na investigação epidemiológica, pois possibilitam a realização de genotipagem dos microorganismos, com grande poder discriminatório. Entre eles, podemos citar a ribotipagem e a tipagem por PFGE (*Pulsed Field Gel of Electrophoresis*), considerado o padrão ouro. Outro método utilizado para este fim é o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que utiliza *primers* curtos em condições de baixa temperatura de pareamento, permitindo a amplificação de fragmentos do DNA de modo aleatório, e gerando uma “impressão digital” do genoma bacteriano. Este método já foi aplicado para discriminação de cepas de *P. aeruginosa* (Mahenthiralingam et al., 1996a; Silva Filho et al., 2001) e do complexo *B. cepacia* (Mahenthiralingam et al., 1996b), com excelentes resultados. A técnica de RAPD tem como vantagens a utilização de pequenas amostras de DNA, a simplicidade (PCR), a rapidez e o poder de discriminação, considerado

satisfatório, mesmo quando comparado ao PFGE (Segonds et al., 1997).

Diversos estudos neste sentido vêm sendo realizados em países como França, Inglaterra, Canadá e Itália e, em grande parte destes, tem sido sugerida a ocorrência de infecções cruzadas (Segonds et al., 1997; Clode et al., 2000; Speert et al., 2002; Manno et al., 2004).

Existem poucos estudos nacionais sobre as infecções pelo complexo *B. cepacia* em pacientes com fibrose cística. Alguns destes estudos são relatos de casos (Marques et al., 1993; Carvalho et al., 2005) e outros são estudos de descrição de casuística, apresentando-se a prevalência das infecções respiratórias nos pacientes com fibrose cística (Alvarez et al., 2004). Existem ainda relatos nacionais de infecções pelo complexo *B. cepacia* envolvendo pacientes sem fibrose cística submetidos à hemodiálise, onde são descritos surtos de bacteremia por *B. vietnamiensis* e *B. cenocepacia* em um hospital de Recife (Magalhães et al., 2003) e também por outra cepa do complexo *B. cepacia* de identidade desconhecida, em um hospital de São Paulo, sendo, neste último estudo, identificada a água como fonte de contaminação (Souza et al., 2004).

Pouco se conhece no país acerca da distribuição dos genovares, epidemiologia e prevalência dos fatores de virulência em amostras do complexo *B. cepacia* isoladas de pacientes com fibrose cística. Silva Filho et al. (2002), em estudo realizado no Instituto da Criança HC-FMUSP, relataram aumento significativo da identificação de bactérias do complexo *B. cepacia* em amostras de escarro e orofaringe de pacientes com fibrose cística utilizando um meio seletivo. Neste estudo, a identificação dos

genomovares foi realizada através de um método de PCR, o qual compreendia a seqüência do RNA ribossomal 16S-23S (Whitby et al., 2000), mas a técnica não permitia diferenciar os genomovares I do III, que representaram a maior parte das cepas estudadas (Silva Filho et al., 2002). Em outro estudo realizado no Recife, 59 cepas do complexo *B. cepacia* foram avaliadas, porém apenas 11 destas pertenciam a pacientes com fibrose cística. Destas, duas cepas foram identificadas como *B. cenocepacia*, duas como *B. multivorans*, uma como *B. cepacia* (genomovar I) e as demais não tiveram o genomovar identificado. Entre as amostras de pacientes sem fibrose cística, 71,8% eram *B. cenocepacia*. Também foram pesquisados os fatores de virulência e 22 das 28 cepas de *B. cenocepacia* foram positivas para BCESM e apenas duas cepas, de pacientes sem fibrose cística, foram positivas para a presença do gene *cbiA* (Detiska et al., 2003).

A Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP é um dos centros de referência para atendimento de pacientes com fibrose cística no país. Não existe no Brasil nenhum centro estabelecido como referência para identificação ou determinação de “genomovares” do complexo *B. cepacia*. A capacitação de profissionais e laboratórios, neste sentido, é uma demanda crescente dos principais centros de atendimento à fibrose cística no país.

A importância e as dificuldades da identificação bacteriana adequada, além do risco de infecções cruzadas entre os pacientes com fibrose cística, têm motivado a realização de diversos estudos nessa área dentro da Unidade (Silva Filho et al., 1999; Silva Filho et al., 2001; Silva

Filho et al., 2002; Monte, 2005). Embora a segregação dos pacientes de acordo com a colonização respiratória não tenha sido implementada na Unidade até o momento, infecções cruzadas por cepas de *P. aeruginosa* não foram identificadas entre os nossos pacientes. (Silva Filho et al., 2001). Entretanto, esta situação não é estática e a monitorização contínua é altamente recomendada (Saiman et al., 2004), envolvendo também outros patógenos com potencial de disseminação ambiental e interpessoal.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS:

GERAL:

Analisar as cepas do complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de pacientes com fibrose cística acompanhados na Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança, nos períodos de setembro de 2000 a abril de 2001 e de junho de 2003 a junho de 2004.

ESPECÍFICOS:

1) Identificar o genótipo e a presença de fatores de virulência entre as cepas do complexo *Burkholderia cepacia* isoladas destes pacientes.

2) Analisar as cepas do complexo *Burkholderia cepacia* através de genotipagem pela técnica de RAPD.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. MÉTODOS:

3.1. Pacientes

Foram avaliados os pacientes em seguimento na Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança (n = 140), com diagnóstico de fibrose cística realizado de acordo com os critérios estabelecidos em Consenso Internacional (Rosenstein et al., 1998). Todos os pacientes que apresentaram pelo menos uma cultura positiva para o complexo *Burkholderia cepacia* nos períodos de setembro de 2000 a abril de 2001 (primeiro período) e de junho de 2003 a junho de 2004 (segundo período) foram incluídos (n=21). Só foram consideradas as culturas de trato respiratório (escarro e esfregaço de orofaringe) realizadas na Seção de Microbiologia do Laboratório Central do HC-FMUSP (primeiro período) e na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz (segundo período). Os pacientes avaliados nos referidos períodos participaram de estudos prospectivos de vigilância microbiológica, após seus pais (ou responsáveis) assinarem termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A), e as cepas isoladas nestes períodos foram estocadas.

Através de revisão de prontuários, foram coletados dados como idade, sexo, peso, altura, índice de massa corpórea (IMC), presença da mutação delta F508 (mutação genética mais comum nestes pacientes, presente em até 70% dos alelos) (Rowe et al., 2005) e colonização bacteriana prévia por *P. aeruginosa*. A gravidade da doença foi estimada

através do escore clínico-radiológico de Shwachman-Kulczycki (ANEXO B) e de dados de espirometria (Volume Expiratório Forçado no 1º segundo – VEF1). A melhor espirometria foi selecionada e os resultados expressos em percentagem do valor previsto para altura, sexo e idade baseados nas equações de Polgar e Promadhat (1971) e Polgar e Weng (1979). Os dados obtidos no início da colonização estão apresentados de forma resumida em uma tabela (ANEXO C).

3.2. Amostras

Foram utilizadas as cepas pertencentes ao complexo *B. cepacia* isoladas no decorrer dos períodos supracitados (setembro de 2000 a abril de 2001 e junho de 2003 a junho de 2004). Este último período refere-se ao projeto de pesquisa intitulado “Epidemiologia de bacilos gram negativos não fermentadores de glicose isolados do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística”, que compreendia coletas de secreções do trato respiratório de pacientes com fibrose cística em seguimento na Unidade durante um ano. Todas as coletas foram realizadas pelas Dras. Kátia M. Martins e Giuliana F. Fongaro e pelo Dr. Luiz Vicente R. F. da Silva Filho, sempre após as consultas ambulatoriais dos pacientes. As amostras eram armazenadas em caixa de isopor com gelo, sendo imediatamente encaminhadas à Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, após o término das consultas médicas.

Adicionalmente, cepas do complexo *B. cepacia* isoladas durante o

projeto de pesquisa concluído em 2002 (“Avaliação da colonização bacteriana do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística através da técnica de *multiplex* PCR”) foram utilizadas. Estas cepas estavam estocadas sob baixas temperaturas no laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical.

Além das amostras clínicas do complexo *B. cepacia* isoladas, cepas “padrão” (*type strains*) do complexo *B. cepacia*, representando os nove genovares atualmente conhecidos, foram empregadas como controle nos experimentos. Dentre essas, vale ressaltar a utilização de sete cepas adquiridas e pertencentes aos genovares VI a IX, gentilmente cedidas pelo Dr. Eshwar Mahentiralingham, da Universidade de Cardiff, Escócia e uma cepa pertencente ao genovar III que apresenta os dois fatores de virulência, cedida pelo Dr. John J. LiPuma, da Universidade de Michigan, EUA. Estas cepas estão apresentadas no QUADRO 2.

3.3. Cultura e identificação bacterianas

As amostras de escarro e esfregaço de orofaringe foram homogeneizadas pelo vortex com igual volume de N-acetil-L-cisteína 0,5% e submetidas a diversas diluições. A partir daí, foram cultivadas em placas de ágar MacConkey e ágar seletivo para o complexo *B. cepacia* (*B. cepacia* médium – Oxoid), permanecendo incubadas a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 18 a 72 horas.

QUADRO 2. Painei de cepas típicas (*type strains*) e de origem conhecida utilizadas durante o estudo.

NOME	ESPÉCIE	ORIGEM
BC ATCC 25416 – Genomovar I	<i>B. cepacia</i> genomovar I	<i>American Type Culture Collection</i>
BC 1254 Genomovar I	<i>B. cepacia</i> genomovar I	Universidade Estadual do Rio de Janeiro (Dra. Elizabeth Marques)
BC 788 Genomovar II	<i>Burkholderia multivorans</i>	
BC 818 Genomovar IIIA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	
BC 805 Genomovar IIIB	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	
BC 842 Genomovar IIIB	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	
BC 790A Genomovar IV	<i>Burkholderia stabilis</i>	
BC 790B Genomovar IV	<i>Burkholderia stabilis</i>	
BC 825 Genomovar IV	<i>Burkholderia stabilis</i>	
BC 1109 Genomovar V	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	
BC LMG 18943 Genomovar VI	<i>Burkholderia dolosa</i>	<i>The Burkholderia cepacia International Typing Study Group</i> (Dr. Eshwar Mahenthiralingam)
BC ATCC 53266 Genomovar VII	<i>Burkholderia ambifaria</i>	
BC AMMD Genomovar VII	<i>Burkholderia ambifaria</i>	
BC LMG 20980 Genomovar VIII	<i>Burkholderia anthina</i>	
BC LMG 16670 Genomovar VIII	<i>Burkholderia anthina</i>	
BC LMG 1419 Genomovar IX	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	
BC ATCC 39277 Genomovar IX	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	
AU 0355 (genes <i>cbIA</i> e <i>esmR</i> positivos)	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Cedida por John J. LiPuma (<i>University Michigan</i>)

No primeiro período do estudo, a identificação bacteriana foi realizada por sistema automatizado Vitek® (bioMérieux Vitek Inc., St Louis, Mo) na Seção de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP, aplicando-se cartões para gram positivos (GNI) e gram negativos (GPI) e testes bioquímicos convencionais quando necessário. No

segundo período, a quantificação e a identificação foram feitas através de testes fenotípicos clássicos, incluindo uma extensa série de provas bioquímicas convencionais, implantadas na rotina do setor de Enterobactérias e outros bacilos gram negativos da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

3.4. Extração e quantificação do DNA

O DNA das amostras foi extraído a partir de uma suspensão de bactérias retiradas da placa de cultivo e colocadas em tubos estéreis (*eppendorfs*) contendo PBS (solução salina tamponada com fosfato). Após centrifugação a 5000g durante 5 minutos, os *pellets* bacterianos foram submetidos ao procedimento de extração do DNA, através do método de digestão com proteinase K, seguido de extração com fenol-clorofórmio (ANEXO D) (Sambrook et al., 1989). A quantificação do DNA foi realizada em um espectrofotômetro de luz ultravioleta (BioPhotometer 6131 – Eppendorf AG, Germany). Após a quantificação, as amostras foram diluídas para concentrações de 100 ng/μl e 20 ng/μl para utilização nas reações de PCR.

3.5. Determinação dos genomovares das cepas do complexo *B. cepacia*

A determinação dos genomovares I a VII do complexo *B. cepacia* foi realizada através de amplificação de segmentos específicos do gene

recA e seqüenciamento dos mesmos para verificação dos resultados. Os *primers* para identificação dos genomovares I a V foram aqueles descritos por Mahenthiralingam et al. (2000). Os *primers* para identificação do genomovar VI foram descritos por Vermis et al. (2004) e para o genomovar VII, os descritos por Coenye et al. (2001a).

As características dos *primers* selecionados são apresentadas no QUADRO 3 e as reações que foram realizadas estão descritas em detalhes no ANEXO E.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (0,5 mg/ml), seguida de análise por trans-iluminação com luz ultravioleta, de acordo com precauções universais, a fim de se prevenir contaminações das reações (Kwok et al., 1989). Os resultados foram registrados através de captura da imagem em equipamento específico (Alphamager®, Alpha Innotech Co, EUA) e armazenados no disco rígido do computador.

Todas as amostras também foram submetidas a uma reação de PCR (nas mesmas condições descritas no ANEXO E) com os *primers* BCR1 e BCR2, que amplificam todo o gene *recA*, gerando um produto de 1 kb. Estes *primers* são altamente específicos para o complexo *B. cepacia* e não apresentam reação cruzada com outras espécies de *Burkholderia* ou outros patógenos comuns em pacientes com fibrose cística (Mahenthiralingam et al., 2000; Mahenthiralingam et al., 2002).

Para o seqüenciamento do gene *recA*, foram utilizados outros dois *primers* (BCR3 e BCR4) que, em associação aos anteriormente citados,

produzem amplicómeros de aproximadamente 500 pb cada (Mahenthiralingam et al., 2000) (QUADRO 3). Os amplicómeros foram purificados, quantificados e submetidos à reação de sequência utilizando-se os *primers* correspondentes e o *kit Big Dye Terminator* (Applied Biosystems Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA). Este método utiliza dideoxinucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes diferentes para cada um deles (ddA, ddC, ddT, ddG), permitindo a leitura concomitante em um mesmo sensor do aparelho de seqüenciamento automatizado (ABI PRISM 377 - Applied Biosystems Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA). Os resultados obtidos foram comparados com dados do Genbank utilizando o programa BLAST, disponível no Centro Nacional para Informação Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Amostras, cujas reações de PCR com os *primers* BCR1 e BCR2 não geraram produtos, foram submetidas a uma nova reação de PCR, nas mesmas condições descritas por Payne et al. (2005) (ANEXO F). Foram utilizados os *primers* BUR1 e BUR2, que amplificam parte do gene *recA* comum a quase todas as espécies de *Burkholderia*, inclusive aquelas pertencentes ao complexo *B. cepacia*. Este par de *primers* não é absolutamente específico para o gênero *Burkholderia* e ocorrem reações cruzadas com cepas dos gêneros *Pandoraea*, *Bordetella*, *Xanthomonas* e *Ralstonia*. O produto gerado tem 869 pb e, a partir deste, também foi realizado o seqüenciamento genético (Payne et al., 2005).

Todas as reações incluíram pelo menos um controle positivo (amostra de DNA de genótipo conhecido do complexo *B. cepacia*) e um

controle negativo (amostra sem adição de DNA).

Todas as reações, de PCR ou seqüenciamento, foram realizadas pela Dra. Kátia M. Martins, sob orientação do Dr. Luiz Vicente R. F. da Silva Filho, no laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

3.6. Pesquisa dos marcadores de virulência de cepas do complexo *B. cepacia*

Os fatores de virulência selecionados para estudo foram a presença do *pili* tipo II (*cab*le pilus) e do gene *esmR* (que codifica o marcador de cepa epidêmica de *B. cepacia* - BCESM). As reações de PCR para identificação do gene *cb*lA foram realizadas como descrito por Sajjan et al. (1995) e a identificação do gene *esmR* foi realizada como descrito por Mahenthiralingam et al. (1997), empregando-se os *primers* apresentados no QUADRO 3. As misturas utilizadas nas reações estão descritas no ANEXO G e também foram realizadas pela Dra. Kátia M. Martins. Todas as reações incluíram um controle positivo (amostra de DNA de cepa do complexo *B. cepacia* sabidamente portadora dos genes de virulência – AU0355) e um controle negativo (sem adição de DNA).

QUADRO 3. Características dos *primers* utilizados durante o estudo.

GENE/GENOMOVAR	PRIMERS	SEQUENCIA (5' → 3')	T _m (°C)	TAMANHO DO PRODUTO (pb)
<i>B.cepacia</i> genomovar tipo I	BCRG11	CAGGTCGTCTCCACGGGT	62	492
	BCRG12	CACGCCGATCTTCATACGA		
<i>B.multivorans</i> (genomovar tipo II)	BCRBM1	CGGCGTCAACGTGCCGGAT	62	714
	BCRBM2	TCCATCGCCTCGGCTTCGT		
<i>B.cenocepacia</i> (genomovar tipo III-A)	BCRG3A1	GCTCGACGTTCAATATGCC	62	378
	BCRG3A2	TCGAGACGCACCGACGAG		
<i>B.cenocepacia</i> (genomovar tipo III, RG-B)	BCRG3B1	GCTGCAAGTCATCGCTGAA	60	781
	BCRG3B2	TACGCCATCGGGCATGCT		
<i>B.stabilis</i> (genomovar tipo IV, RG-4)	BCRG41	ACCGGCGAGCAGGCGCTT	64	647
	BCRG42	ACGCCATCGGGCATGGCA		
<i>B.vietnamiensis</i> (genomovar tipo V, RG-BV)	BCRBV1	GGGCGACGGCGACGTGAA	62	378
	BCRBV2	TCGGCCTTCGGCACCAGT		
<i>B.dolosa</i> (genomovar tipo VI)	G6N	CGAGCGAGCCGGTCGAT	67	135
	BCR1	TGACCGGCGAGAAGAGCAA		
<i>B.ambifaria</i> (genomovar tipo VII)	BCRGC1	GTCGGGTAAAACCACGCTG	62	810
	BCRGC2	ACCGCAGCCGCACCTTCA		
Complexo <i>B. cepacia</i> – Gene <i>recA</i>	BCR1	TGACCGGCGAGAAGAGCAA	58	527
	BCR4	GCGCAGCGCCTGCGAACAT		
	BCR2	CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC	58	532
	BCR3	GTCCGAGGCGCTGCGCAA		
Gênero <i>Burkholderia</i>	BUR1	GATCGAAGAAGCAGTTCGGCAA	60	869
	BUR2	TTGTCTTGCCCTGAGCCGAT		
Cable pilus - Gene <i>cbIA</i>	CBL1	CCAAAGGACTAACCCA	55	664
	CBL2	ACGCGATGTCCATCACA		
Epidemic strain marker - Gene <i>esmR</i>	BCESM1	CCACGGACGTGACTAACA	63	1400
	BCESM2	CGTCCATCCGAACACGAT		

3.7. Estudo epidemiológico molecular (RAPD)

As amostras do complexo *B. cepacia* foram submetidas à análise pela técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), com o intuito de obter discriminação entre as cepas, para fins epidemiológicos. As reações de RAPD foram realizadas de acordo com a descrição de Mahenthiralingam et al. (1996b), utilizando o *primer* 272 (5'-AGCGGGCCAA-3'). A mistura e as condições para as reações estão descritas no ANEXO H.

Os produtos de RAPD foram visualizados em gel de acrilamida (7,5%) corado com nitrato de prata (0,2%). A interpretação dos resultados de RAPD foi feita de acordo com os critérios de Tenover et al. (1995), porém realizada através de visualização direta das bandas, sem auxílio de qualquer sistema informatizado. Todo o procedimento também foi realizado pela Dra. Kátia M. Martins no laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical.

3.8. Análise estatística

A análise estatística foi descritiva e envolveu medidas de tendência central e dispersão. O intervalo de confiança calculado foi de 95%. A análise estatística foi desenvolvida com auxílio do CIA 2000 versão 2.0.0 (*Confidence Interval Analysis*) e Microsoft® Excel 2002.

RESULTADOS

4. RESULTADOS:

4.1. Determinação dos genômovares

Foram coletadas 672 amostras clínicas dos 140 pacientes com fibrose cística nos dois períodos analisados. A identificação de cepas do complexo *B. cepacia* ocorreu em 41 amostras (35 amostras de escarro e 6 esfregaços de orofaringe) de 21 pacientes (TABELA 1).

TABELA 1. Cepas do complexo *B. cepacia* isoladas nos dois períodos do estudo.

Período	Amostras colhidas (número de pacientes *)	Amostras com identificação do complexo <i>B. cepacia</i> (%)	Pacientes infectados (%) Intervalo de confiança 95%
2000-2001	257 (106)	11 (4,2%)	8 (7,5%) IC: 3,9% - 14,2%
2003-2004	415 (114)	30 (7,2%)	16 (14%) IC: 8,8% - 21,6%
TOTAL	672 (140)	41 (6,1%)	21 (15%) IC: 10% - 21,8%

* alguns pacientes foram incluídos nos dois períodos do estudo

Todas as cepas identificadas fenotipicamente como pertencentes ao complexo *B. cepacia* foram submetidas a reações de PCR com o painel de *primers* (QUADRO 1), de forma seqüencial. As reações de PCR produziram

fragmentos de tamanho esperado para cada uma das combinações de *primers* empregadas (FIGURA 1). Em algumas ocasiões, observou-se o aparecimento de produtos inespecíficos, de tamanhos diversos, principalmente com os *primers* direcionados para o genomovar IIIA, mas este problema foi minimizado com o aumento da temperatura de pareamento dos *primers*.

FIGURA 1. Imagens de corridas eletroforéticas em gel de agarose a 1,5%, com coloração por brometo de etídio e revelação em transiluminador ultravioleta. Observa-se amplificação de fragmentos do gene *recA* do complexo *B. cepacia*. Marcador: 100 bp (Pharmacia). A primeira amostra de cada fotografia corresponde ao DNA de uma cepa padrão de cada genomovar do complexo *B. cepacia*; as demais são amostras isoladas dos pacientes e, a última, um controle negativo (sem adição de DNA)

Foi possível determinar o genomovar de 32 das 41 amostras (78%) e o resultado está apresentado na TABELA 2. O genomovar mais prevalente foi a *B. cenocepacia* (17 cepas pertencentes a 9 pacientes), sendo apenas uma cepa identificada como genomovar IIIB, seguida pela *B. multivorans* (12 cepas pertencentes a 4 pacientes). Somente duas cepas foram identificadas como *B. vietnamensis* (pertencentes a pacientes distintos) e uma como *B. cepacia* (genomovar I) (GRÁFICO 1). Não foi encontrada nenhuma cepa dos genomovares IV, VI e VII entre as amostras analisadas.

Todas as amostras que apresentaram amplificação do gene *recA* (*primers* BCR1/2) (FIGURA 2) foram submetidas a reação de seqüenciamento e os resultados estão apresentados na TABELA 2. Observou-se uma concordância de 100% entre os achados do seqüenciamento e os resultados obtidos com o painel de *primers* para a determinação dos genomovares.

GRÁFICO 1. Distribuição dos genomovares encontrados nos pacientes com fibrose cística.

FIGURA 2. Imagem de corridas eletroforéticas em gel de agarose a 1,5%, com coloração por brometo de etídio e revelação em transiluminador ultravioleta. Observa-se amplificação do gene *recA* do complexo *B. cepacia*. Marcador: 100 bp (Pharmacia). A primeira amostra corresponde ao DNA de uma cepa padrão do complexo *B. cepacia*; as demais são amostras isoladas dos pacientes e, a última, um controle negativo (sem adição de DNA)

Pacientes com um determinado genomovar no primeiro período mantiveram a mesma característica das cepas por até três anos. Em cinco pacientes não foi possível a identificação do genomovar de *B. cepacia* em nenhuma das amostras. Todas as nove amostras que não resultaram em aparecimento de produtos com nenhum dos nove pares de *primers* foram re-testadas pelo menos em duas ocasiões, confirmando-se a impossibilidade de caracterizar seu genomovar deste modo. Estas nove amostras também não resultaram positivas com os *primers* BCR1 e BCR2, sugerindo, portanto, um erro de identificação fenotípica.

As amostras não identificadas foram submetidas à reação de PCR com os *primers* BUR1 e BUR2, sendo gerados produtos de amplificação em sete delas. Após o seqüenciamento destes, confirmou-se erro de identificação fenotípica, já que cinco delas eram *Burkholderia gladioli* (sendo quatro delas pertencentes ao paciente O) e duas amostras eram *Xanthomonas campestris* (TABELA 2). Portanto, apesar do empenho na identificação de todas as amostras, duas delas ainda ficaram sem identificação, mas sabemos que não pertencem ao complexo *B. cepacia*. Portanto, dos 21 pacientes inicialmente considerados como infectados pelo complexo *B. cepacia*, após estes resultados, confirmamos apenas 16.

TABELA 2. Resultados da caracterização de genomovar, seqüenciamento do gene *recA* e genotipagem por RAPD de cepas isoladas dos pacientes com fibrose cística e fenotipicamente identificadas como membros do complexo *B. cepacia* durante o estudo.

Paciente	Amostra	Data do isolamento	Genomovar	Marcador de cepa epidêmica (<i>esmR</i>)	Padrão de RAPD	Seqüenciamento do gene <i>recA</i>
A	1	26/05/2004	ND	-	1	<i>X. campestris</i>
B	2	10/03/2004	IIIA	-	2	<i>B. cenocepacia</i>
C	3	08/08/2003	IIIA	-	3	<i>B. cenocepacia</i>
D	4	15/01/2001	IIIA	-	4	<i>B. cenocepacia</i>
D	5	04/02/2004	IIIA	-	4	<i>B. cenocepacia</i>
E	6	10/01/2001	I	-	5	<i>B. cepacia</i>
E	7	24/01/2001	ND	-	6	ND
F	8	23/06/2003	IIIA	-	7	<i>B. cenocepacia</i>
F	9	26/11/2003	IIIA	-	7	<i>B. cenocepacia</i>
F	10	04/02/2004	IIIA	-	7	<i>B. cenocepacia</i>
F	11	14/04/2004	IIIA	-	7	<i>B. cenocepacia</i>
G	12	19/04/2004	V	-	8	<i>B. vietnamiensis</i>
H	13	24/07/2003	IIIA	-	9	<i>B. cenocepacia</i>
H	14	27/11/2003	IIIA	-	9	<i>B. cenocepacia</i>
H	15	29/01/2004	IIIA	-	9	<i>B. cenocepacia</i>
H	16	06/05/2004	IIIA	-	10	<i>B. cenocepacia</i>
I	17	14/03/2001	V	-	11	<i>B. vietnamiensis</i>
J	18	09/06/2003	ND	-	12	<i>B. gladioli</i>
K	19	27/09/2000	IIIB	+	13	<i>B. cenocepacia</i>
L	20	05/10/2000	II	-	14	<i>B. multivorans</i>
L	21	18/12/2000	II	-	-	<i>B. multivorans</i>
L	22	14/07/2003	II	-	14	<i>B. multivorans</i>
L	23	03/12/2003	II	-	14	<i>B. multivorans</i>
L	24	08/03/2004	II	-	14	<i>B. multivorans</i>
L	25	17/05/2004	II	-	14	<i>B. multivorans</i>
M	26	14/04/2004	II	-	15	<i>B. multivorans</i>
N	27	10/05/2004	IIIA	+	16	<i>B. cenocepacia</i>
O	28	03/07/2003	ND	-	17	<i>B. gladioli</i>
O	29	24/07/2003	ND	-	17	<i>B. gladioli</i>
O	30	10/12/2003	ND	-	17	<i>B. gladioli</i>
O	31	05/05/2004	ND	-	17	<i>B. gladioli</i>
P	32	16/10/2000	IIIA	-	18	<i>B. cenocepacia</i>
P	33	07/02/2001	IIIA	-	18	<i>B. cenocepacia</i>
Q	34	24/11/2003	II	-	19	<i>B. multivorans</i>
R	35	11/02/2004	ND	-	20	ND
S	36	30/10/2000	II	-	21	<i>B. multivorans</i>
S	37	26/01/2004	II	-	21	<i>B. multivorans</i>
S	38	29/03/2004	II	-	21	<i>B. multivorans</i>
S	39	22/04/2004	II	-	21	<i>B. multivorans</i>
T	40	07/02/2001	ND	-	22	<i>X. campestris</i>
U	41	19/05/2004	IIIA	-	23	<i>B. cenocepacia</i>

ND: não determinado

4.2. Pesquisa dos marcadores de virulência

A pesquisa do gene da pilina (gene *cbIA*) resultou negativa em todas as amostras estudadas. Neste sentido, o envio da cepa padrão epidêmica isolada originalmente no Canadá e gentilmente cedida pelo Dr. John LiPuma foi de extrema importância, pois possibilitou a verificação do adequado funcionamento da reação de PCR para amplificação do gene *cbIA*.

Apenas duas amostras resultaram positivas para o marcador *esmR*, com os *primers* BCESM1/2 – amostra 19, paciente K, única amostra caracterizada como genomovar IIIB, e amostra 27, paciente N, caracterizada como genomovar IIIA (TABELA 2). Os dois pacientes tinham apenas uma amostra colhida durante o estudo (FIGURA 3).

FIGURA 3. Imagens de corridas eletroforéticas em gel de agarose a 1,5%, com coloração por brometo de etídio e revelação em transiluminador ultravioleta. Observa-se amplificação do gene *cbIA* (imagem superior) e do gene *esmR* (imagem inferior). Marcador: 100 bp (Pharmacia). A primeira amostra corresponde ao DNA de uma cepa padrão do complexo *B. cepacia*, as demais são amostras isoladas dos pacientes e, a última, um controle negativo (sem adição de DNA)

4.3. Estudo epidemiológico molecular

As reações de RAPD resultaram em 23 padrões distintos para um total de 40 amostras avaliadas. Apenas uma amostra não resultou em produtos na reação de RAPD. A avaliação foi visual, sem o emprego de qualquer recurso de informática, e algumas vezes observamos intensidades distintas nas bandas de cada padrão, porém sem impedir a avaliação do gel (FIGURA 4).

Não se observou a ocorrência de padrões idênticos entre amostras de pacientes distintos. Em geral, os pacientes com mais de uma amostra do complexo *B. cepacia* isolada apresentaram um padrão único para todas suas amostras. Entretanto, foram observados mais de um padrão de RAPD nas duas amostras do paciente CHT (amostras 6 e 7), além de mais de um padrão entre as amostras do paciente FAS (amostras 13 a 16) (TABELA 2). Deste modo, houve concordância entre os achados de RAPD e da

determinação de genomovares.

FIGURA 4. Genotipagem por RAPD de cepas do complexo *B. cepacia* isoladas de pacientes com fibrose cística, utilizando o *primer* 272, e visualizada em gel de acrilamida a 7,5% corado com nitrato de prata (0,2%). Cada grupo de cepas contidas entre as linhas vermelhas pertencem ao paciente identificado pelas iniciais do seu nome

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO:

O presente estudo mostrou que a distribuição dos genovares do complexo *Burkholderia cepacia* em nossa Instituição é muito semelhante ao observado em outros lugares do mundo, com predomínio das espécies *B. cenocepacia* e *B. multivorans* (Mahenthiralingam et al., 2002; LiPuma., 2005). Entretanto, observamos uma prevalência da infecção pelo complexo *B. cepacia* de 11,4%, ou seja, 16 pacientes estavam infectados entre os 140 pacientes incluídos no estudo, valor este significativamente maior que a prevalência de 2,9% descrita atualmente para a população de pacientes americanos com fibrose cística (Cystic Fibrosis Foudation Registry, 2004). Porém, estudos realizados com pacientes adultos com fibrose cística de outros países, como Canadá, Itália e Portugal, encontraram prevalências que variam de 5 a 25% (Frangolias et al., 1999; Agodi et al., 2001; Speert et al., 2002; Cunha et al., 2003; Manno et al., 2004). Existem poucos dados nacionais de prevalência da infecção pelo complexo *B. cepacia* em pacientes com fibrose cística, mas um estudo recentemente realizado na cidade de Campinas encontrou uma prevalência também inferior à nossa, de 5,2% durante um período de 10 anos, porém não foi utilizado meio seletivo para *B. cepacia* na cultura microbiológica (Alvarez et al., 2004), o que poderia reduzir a freqüência de isolamento deste agente patogênico.

Embora as infecções pelo complexo *B. cepacia* tenham sido reconhecidas desde o início da década de 80, a taxonomia dos membros do complexo e de todo o gênero *Burkholderia* ainda está sendo modificada, de

tal forma que novos componentes estão sendo freqüentemente propostos, como foi recentemente incluída a *B. ubonensis* (Coeney et al., 2003b; LiPuma., 2005), considerada o décimo membro do complexo.

Há uma grande variabilidade na distribuição dos genovares através do mundo e o impacto clínico relacionado a cada um deles vem sendo mais bem esclarecido nos últimos anos. Sabe-se que todas as espécies pertencentes ao complexo *B. cepacia* são potencialmente capazes de causar infecção nos seres humanos, mas existem diferenças significativas de prevalência nas diversas regiões do mundo. Em nosso estudo, a prevalência maior foi da espécie *B. cenocepacia*, com 53%, seguida da *B. multivorans* (37,5%), *B. vietnamiensis* (6,2%) e *B. cepacia* (3,1%). Os demais membros do complexo *B. cepacia* não foram isolados entre nossos pacientes. A *B. cenocepacia* também é a espécie mais comumente isolada entre pacientes com fibrose cística em países como Canadá (Speert et al., 2002), Estados Unidos (LiPuma et al., 2001), Portugal (Cunha et al., 2003) e Itália (Agodi et al., 2001), mas a prevalência pode variar de 50% das cepas nos Estados Unidos, até 80% em centros canadenses. Entretanto, dados provenientes da Bélgica mostram somente 27,3% das cepas como *B. cenocepacia*, e uma predominância de infecções pela *B. multivorans* (57,8%) (Coeney et al., 2003). Existem poucos dados brasileiros sobre a distribuição de genovares do complexo *B. cepacia* entre os pacientes com fibrose cística. Em um destes estudos, foram avaliadas 11 cepas do complexo *B. cepacia* isoladas de pacientes com fibrose cística da cidade de Recife. Dentre estas, somente cinco foram

identificadas pelas reações de PCR: duas cepas de *B. cenocepacia* (18,2%), duas cepas de *B. vietnamiensis* (18,2%) e uma cepa de *B. cepacia* (9,1%) (Detiska et al., 2003). Há ainda um relato de caso de infecção transitória por *B. multivorans* e *B. cenocepacia* em um paciente com fibrose cística infectado cronicamente por *B. vietnamiensis* (Carvalho et al., 2005).

Estudos experimentais mostraram que a *B. cenocepacia* é capaz de invadir macrófagos e células do epitélio respiratório, se replicar e ainda sobreviver maiores períodos quando comparada a *B. multivorans*, sugerindo maior virulência dos membros daquela espécie (Martin et al., 2000). Dados clínicos indicam declínio acelerado da função pulmonar e também redução na sobrevida de pacientes com fibrose cística infectados pela *B. cenocepacia*, quando comparados àqueles infectados apenas por *P. aeruginosa* ou *B. multivorans* (Vandamme et al., 2002; Courtney et al., 2004; Jones et al., 2004). Alguns autores também sugeriram que a infecção por *B. cenocepacia* cronifica-se mais que a infecção pela *B. multivorans*, sendo esta geralmente associada a infecções de caráter transitório (Mahenthiralingam et al., 2002; Jones et al., 2004; LiPuma., 2005). Os dados de nosso estudo indicam o contrário, já que dois pacientes infectados pela *B. multivorans* mantiveram a mesma cepa por no mínimo três anos (TABELA 2).

As infecções pelo complexo *B. cepacia* em pacientes com fibrose cística também estão relacionadas a piores prognósticos após o transplante pulmonar. Chaparro et al. (2001) publicaram um estudo retrospectivo envolvendo pacientes com fibrose cística que realizaram transplante

pulmonar, e observaram 19 mortes entre 53 pacientes, sendo que a *B. cepacia* foi envolvida em 14 destes óbitos. Por isso, na maior parte dos centros mundiais para tratamento destes pacientes, a infecção pelo complexo *B. cepacia* é considerada uma contra-indicação relativa para a realização de transplante pulmonar, devido às altas taxas de mortalidade no pós-operatório. Aris et al. (2001) determinaram a influência do genótipo do complexo *B. cepacia* no resultado do transplante pulmonar de pacientes com fibrose cística e encontraram um aumento significativo da mortalidade apenas em pacientes infectados pela *B. cenocepacia*, não observando maior risco para os pacientes infectados pela *B. multivorans*.

Apesar do nosso estudo ter sido realizado apenas com pacientes pediátricos, alguns destes são elegíveis para o transplante pulmonar, e assim os dados obtidos na identificação dos genótipos podem contribuir para a determinação dos potenciais riscos. Recentemente, uma paciente fibrocística de nossa Instituição foi referida para realização de transplante pulmonar em outra cidade e no pré-operatório isolou-se uma cepa do complexo *B. cepacia*, sem caracterização de genótipo. A paciente foi submetida ao transplante, mas apresentou quadro infeccioso grave no pós-operatório precoce, evoluindo para óbito.

A idéia de se utilizar a técnica de PCR para a identificação dos genótipos do complexo *B. cepacia* foi motivada pelo fato de que os métodos fenotípicos são habitualmente insuficientes para este fim (van Pelt et al., 1999; McMenamin et al., 2000; Shelly et al., 2000; Henry et al., 2001; Brisse et al., 2002). Henry et al. (2001) descreveram uma estratégia para

identificação fenotípica dos genomovares do complexo *B. cepacia*, mas o procedimento descrito é bastante trabalhoso e inclui pelo menos 22 provas bioquímicas, além de não permitir diferenciação das espécies *B. cepacia*, *B. cenocepacia* e *B. ambifaria*. Além disso, a similaridade entre as espécies *B. multivorans* e *B. dolosa* é muito alta, podendo gerar erros de identificação.

O desenvolvimento de métodos baseados em PCR para a caracterização dos genomovares vem desde a década de 90. Inicialmente, eram baseados na amplificação de segmentos do gene ribossomal 16S (Bauernfeind 1999, LiPuma 1999), mas a técnica não permitia distinção entre os genomovares I, III e IV. Em 2000, Whitby et al. descreveram outro método de PCR que amplificava seqüências da região de separação dos genes 16S-23S rRNA e conseguiram diferenciar a *B. cenocepacia* da *B. stabilis*, mas não da *B. cepacia* (genomovar I). Este método foi utilizado em um estudo anteriormente realizado em nossa Instituição (Silva Filho et al., 2002) e, apesar das limitações, trouxe informações relevantes, dada a maior probabilidade de infecção pela *B. cenocepacia*, quando comparada à *B. cepacia*. O método que utilizamos no presente estudo explora diferenças na seqüência do gene *recA* e é capaz de diferenciar os genomovares I a VII, sendo inicialmente descrito por Mahenthiralingam et al. (2000), com contribuições posteriores de Vermis et al. (2004) e Coenye et al. (2001a), para os genomovares VI e VII, respectivamente.

O gene *recA* é considerado um gene “housekeeping” e codifica uma proteína multifuncional de mesmo nome que atua entre outras funções na

recombinação e no reparo do DNA bacteriano lesado (Smith et al., 1989). Este gene tem sido explorado como marcador filogenético em vários gêneros de bactérias, pois apesar de bastante conservado entre as mesmas, apresenta diferenças pontuais capazes de permitir a caracterização de espécies (Lloyd et al., 1993).

O método de PCR baseado no gene *recA* mostrou ser excelente para a identificação dos membros do complexo *B. cepacia*, já que foi possível caracterizar a maioria das cepas estudadas (32/41, 78%), e os resultados foram confirmados através de seqüenciamento do gene *recA* em todas as amostras. Vermis et al. (2002) recentemente analisaram o mesmo painel de *primers* e observaram alta sensibilidade e especificidade com os *primers* para a identificação de *B. multivorans*, *B. cenocepacia* e *B. ambifaria*, mas uma menor sensibilidade para a identificação do genomovar I (*B. cepacia*).

A identificação dos genomovares utilizando reações de PCR com o painel de *primers* para o gene *recA* não foi possível em 9 das 41 cepas fenotipicamente caracterizadas como complexo *B. cepacia*, mas estas amostras também não resultaram positivas quando os *primers* BCR1 e BCR2 foram empregados, o que indica erro na identificação fenotípica, já que estes *primers* amplificam o gene *recA* de todos os membros do complexo *B. cepacia*.

Embora a cultura de escarro seja o método recomendado para o isolamento de patógenos respiratórios dos pacientes com fibrose cística, a identificação das cepas do complexo *B. cepacia* nem sempre é um

procedimento simples, e identificações equivocadas são relatadas com frequência (McMenamin et al., 2000, Shelly et al., 2000). McMenamin et al (2000), ao estudarem 1051 amostras de bactérias provenientes de 608 pacientes com fibrose cística de 115 centros de tratamento em 91 cidades dos Estados Unidos, observaram 11% de identificações erradas do complexo *B. cepacia* (erradamente definidas como *B. cepacia* pelos laboratórios de referência) e 36% de cepas do complexo *B. cepacia*, entre amostras não identificadas ou identificadas como outras espécies diferentes.

Em nosso estudo, métodos manuais, com utilização de diversos meios e condições, foram empregados no segundo período, ao invés do sistema comercial Vitek[®], utilizado na primeira parte do estudo, mas, mesmo assim, observamos uma proporção relativamente alta de enganos na identificação fenotípica. Identificações erradas parecem ocorrer com maior frequência quando sistemas automatizados são utilizados, e o sistema *API 20NE* parece ter a melhor eficácia na identificação dos membros do complexo *B. cepacia* (van Pelt et al., 1999). Shelly et al. (2000) avaliaram diversos sistemas comerciais utilizados para identificação de cepas do complexo *B. cepacia*, e observaram valores preditivos positivos variando de 71 a 98% e valores preditivos negativos menores (50 a 82%). Isto indica que o emprego destes métodos implica num risco maior de não se identificarem cepas pertencentes ao complexo *B. cepacia* como tal, o que pode acarretar sérios problemas para os pacientes com fibrose cística.

Análises posteriores das cepas não identificadas através de reações

de PCR e seqüenciamento do DNA foram realizadas utilizando os *primers* BUR1 e BUR2, capazes de amplificar o gene *recA* de todo o gênero *Burkholderia* e de outras espécies relacionadas, e permitiram a caracterização de 7 cepas, identificadas como *Burkholderia gladioli* (5 cepas) e *Xanthomonas campestris* (2 cepas). Embora o meio seletivo para *B. cepacia* seja um excelente meio de cultura para o isolamento do complexo *B. cepacia*, outros organismos similares, tais como *B. gladioli* e *Ralstonia* ssp., também podem crescer neste meio. As duas espécies identificadas em nosso estudo (*B. gladioli* e *X. campestris*) têm seu papel patogênico pouco conhecido em pacientes com fibrose cística (Bauernfeind et al., 1998). A *B. gladioli* é uma espécie freqüentemente confundida com o complexo *B. cepacia*, bem como as espécies *Pandorea* e *Ralstonia* (Shelly et al., 2000). Desta forma, recomenda-se a realização de testes baseados na análise do DNA bacteriano para a confirmação dos resultados de identificação do complexo *B. cepacia*.

Os erros de identificação de patógenos em pacientes com fibrose cística podem ainda influenciar aspectos práticos da vida dos mesmos, já que em alguns países os pacientes com infecção pelo complexo *B. cepacia* são excluídos de atividades sociais e são atendidos em dias e horários distintos nos centros especializados. Deste modo, identificações errôneas de cepas do complexo *B. cepacia* têm sérios riscos médicos e implicações sociais e psicológicas para os portadores de fibrose cística.

A infecção cruzada por cepas do complexo *B. cepacia* já foi demonstrada por diversos autores, podendo ocorrer transmissão entre os

pacientes com fibrose cística em ambiente hospitalar ou contato social, fora do hospital. Estas observações resultaram em diversas recomendações para novos estudos em microbiologia e em coortes de pacientes (Shreve et al., 1999). Com isso, diversos centros de tratamento adotaram políticas de segregação dos indivíduos infectados pelo complexo *B. cepacia* (Govan et al., 1993; Smith et al., 1993; Pegues et al., 1995; Saiman et al., 2004) e quedas significativas da prevalência desta infecção foram relatadas. Em nosso serviço, estas medidas não foram implementadas até o momento e, embora nós não tenhamos evidências de infecções cruzadas por *P. aeruginosa* entre nossos pacientes (Silva Filho et al., 2001), o mesmo precisava ser avaliado com as cepas do complexo *B. cepacia*. Em estudo anterior de nossa Unidade, um aumento significativo no isolamento de cepas do complexo *B. cepacia* foi observado quando se empregou o meio seletivo (Silva Filho et al., 2002). No presente estudo, embora um aparente aumento na prevalência das cepas do complexo *B. cepacia* entre os dois períodos de coleta tenha sido observado, não há evidências de infecções cruzadas entre os pacientes, já que a tipagem molecular pelo RAPD não identificou cepas comuns a diferentes pacientes. A observação deste aumento na prevalência da infecção pelo complexo *B. cepacia* entre o primeiro e o segundo períodos, entretanto, deve ser confirmada por dados adicionais, já que o desenho deste estudo não permite uma conclusão definitiva sobre este assunto. Este aumento da prevalência poderia ainda estar relacionado a diferenças na metodologia aplicada na identificação das cepas nos dois períodos do estudo, já que foram realizadas em laboratórios

distintos e com métodos diferentes, ainda que nos dois períodos o mesmo +meio seletivo para o complexo *B. cepacia* tenha sido empregado.

A epidemiologia molecular através da técnica de RAPD detectou 23 genótipos diferentes entre 40 amostras analisadas, revelando que diferentes pacientes não tiveram genótipos comuns. Além disso, o método de genotipagem mostrou 100% de concordância com os resultados encontrados na identificação dos genomovares, isto é, cepas com um mesmo genótipo apresentavam um único genomovar identificado. Estudos publicados anteriormente já haviam demonstrado que o método de RAPD apresenta um poder de discriminação satisfatório quando comparado ao método de PFGE, considerado o padrão-ouro para a genotipagem bacteriana (Mahenthiralingam et al., 1996b; Segonds et al., 1997). A simplicidade técnica do RAPD pode favorecer seu uso rotineiro para vigilância de surtos e infecções cruzadas em centros de tratamento de pacientes com fibrose cística.

No atual trabalho, também pesquisamos os marcadores de virulência previamente descritos (Sajjan et al., 1995; Mahenthiralingam et al., 1997) e não os encontramos em alta proporção entre as cepas do complexo *B. cepacia*. O marcador de cepa epidêmica (*esmR*) foi encontrado em duas amostras não relacionadas, ambas caracterizadas como *B. cenocepacia*, enquanto o gene da pilina (*cbIA*) não foi identificado em nenhuma cepa.

O marcador epidemiológico *esmR* foi encontrado em uma maior proporção de cepas do complexo *B. cepacia* nos países europeus como Portugal (Cunha et al., 2003) e Itália (Bevivino et al., 2002), mas também

exclusivamente em *B. cenocepacia*, chegando a ser identificado em 61% das amostras desta espécie na Itália. Em contraste, o gene *cbIA* foi isolado em uma baixa proporção de pacientes do estudo italiano (apenas 1 amostra das 68 analisadas), mas numa proporção maior (13,4%) nas amostras provenientes dos pacientes de Portugal. Neste último estudo, o marcador do *callback pilus* não foi identificado apenas na *B. cenocepacia*, mas também na *B. cepacia* (genomovar I).

A baixa prevalência dos marcadores de virulência entre as cepas do complexo isoladas dos nossos pacientes está de acordo com a aparente ausência de infecção cruzada entre eles, uma situação muito diferente da observada em outros países como o Canadá, por exemplo, onde apenas quatro genótipos de *B. cenocepacia* são responsáveis por mais de 80% das infecções (Speert et al., 2002).

Os resultados encontrados em nosso estudo mostraram que a *B. cenocepacia* é, como na maior parte do mundo, a espécie mais prevalente entre os pacientes portadores de fibrose cística e que, apesar da alta prevalência, não evidenciamos infecção cruzada entre eles. A implementação de métodos de biologia molecular já descritos em outros laboratórios não é um procedimento simples e, freqüentemente, são necessárias adaptações significativas. O presente estudo permitiu a padronização de uma série de métodos de biologia molecular para as condições do nosso Laboratório, fato este que habilita a equipe a continuar realizando pesquisas e avaliações relativas à identificação, à epidemiologia e à presença de fatores de virulência das cepas do complexo *B. cepacia*

provenientes da nossa Unidade e até mesmo de outras localidades do nosso país.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES:

- I. O presente estudo mostrou que a *B. cenocepacia* é o membro do complexo *B. cepacia* mais prevalente entre nossos pacientes com fibrose cística;
- II. O método de PCR baseado no gene *recA* mostrou ser um método rápido e satisfatório para a identificação dos membros do complexo *B. cepacia*, possibilitando a identificação de 78% das cepas estudadas;
- III. A prevalência dos fatores de virulência entre as cepas do complexo *B. cepacia* isoladas em nossos pacientes foi muito baixa;
- IV. Embora tenha ocorrido um aparente aumento na prevalência, infecção cruzada não foi confirmada entre nossos pacientes;
- V. Observamos que identificações fenotípicas erradas dos membros do gênero *Burkholderia* podem ocorrer mesmo quando a prática microbiológica é meticulosa, e este achado reforça a necessidade de implementação de métodos moleculares em laboratórios de microbiologia envolvidos no cuidado dos pacientes com fibrose cística.

ANEXOS

7. ANEXOS:

ANEXO A: Termo de consentimento livre e esclarecido entregue aos pais ou responsáveis pelos pacientes com fibrose cística envolvidos no estudo.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS -INFORMAÇÃO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M F
DATA DE NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO.....Nº.....APTO:.....
BAIRRO:.....CIDADE
CEP:..... TELEFONE:DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Epidemiologia de bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose isolados do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística”.

PESQUISADOR: **Dr. Luiz Vicente R. Ferreira da Silva Filho**

CARGO/FUNÇÃO: **MÉDICO**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **69.437**

UNIDADE DO HCFMUSP: **INSTITUTO DA CRIANÇA**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO	X
RISCO BAIXO	RISCO MÉDIO	RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 1 ano

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

Trata-se de uma pesquisa para tentar conhecer melhor as características das bactérias que causam infecção nas crianças com mucoviscidose. Pretende-se estudar, durante um ano, as características de sensibilidade aos antibióticos e fatores de agressividade das bactérias encontradas no escarro e na garganta dos pacientes com mucoviscidose. Para tanto, serão utilizadas as amostras de escarro ou de esfregaço da garganta que você está habituado(a) a colher. As amostras serão colhidas no próprio ambulatório e no dia de atendimento, mas não substituirão as amostras colhidas rotineiramente pois serão estudadas em outro laboratório, somente com fins de pesquisa.

Além das amostras de escarro ou da garganta, serão colhidas amostras de sangue em três ocasiões durante os 12 meses de realização da pesquisa: no início, no meio e no fim do estudo. Estas amostras servirão para verificar se existe reação do organismo à presença das bactérias no escarro e na garganta das crianças e adolescentes com mucoviscidose.

Por fim, dependendo dos resultados dos exames realizados, você poderá receber uma visita da equipe da pesquisa em sua casa, para colher amostras de fontes ambientais da sua casa, tais como água, torneiras e outros líquidos em geral que porventura sejam necessários.

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco,tutor,curador,etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:.....Nº..... APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE.....

CEP:..... TELEFONE: DDD(.....).....

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de DEIXAR DE PARTICIPAR DE QUALQUER PARTE OU DE TODO O ESTUDO, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Fui informado que tal procedimento tem o risco **mínimo** da realização de qualquer coleta de escarro ou esfregaço de garganta, o risco de provocar o vômito durante a coleta.

As coletas de sangue também apresentam o risco **mínimo** de trazer desconforto durante sua realização e provocar o aparecimento de pequeno inchaço ou mancha roxa no local da picada. As condutas necessárias a estes procedimentos bem como as intercorrências previsíveis (vômito, dor durante a punção, inchaço no local) me foram devidamente esclarecidas pela equipe responsável.

POSSO, A QUALQUER MOMENTO, COMO RESPONSÁVEL PELO PACIENTE, SOLICITAR A INTERRUPÇÃO DE QUALQUER PROCEDIMENTO PREVISTO NO ESTUDO E, NESTA SITUAÇÃO, FICA GARANTIDA A CONTINUIDADE DO TRATAMENTO NAS DEPENDÊNCIAS DO INSTITUTO DA CRIANÇA.

Declaro ainda que, TENDO CIÊNCIA QUANTO AOS PROCEDIMENTOS DE

COLETA DE EXAMES a que será submetido, **AUTORIZO** A PARTICIPAÇÃO DO MEU FILHO(A) NESTA PESQUISA.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dr. Luiz Vicente R. F. da Silva Filho – médico assistente da Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança

Bip: 3444-4545 código 95990
Tel. 3069-8537 / 3069-8538 / 3069-8566

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO B: Escore clínico-radiológico de Shwachman-Kulczycki.

Graduação	Pontos	Atividade Geral	Exame Físico	Nutrição	Achados Radiológicos
Excelente (86-100)	25	Atividade íntegra; brinca e joga bola; vai à escola regularmente	Normal – não tosse, FC e FR normais; pulmões livres; boa postura	Peso e altura acima do p25; fezes bem formadas; boa musculatura e tônus	Campos pulmonares limpos
Bom (71-85)	20	Irritabilidade e cansaço no fim do dia; boa frequência na escola	FC e FR normais em repouso; tosse rara; pulmões livres; pouco enfisema	Peso e altura entre p15-20; fezes discretamente alteradas	Pequena acentuação da trama vasobrônquica; enfisema discreto
Médio (56-70)	15	Necessita repousar durante o dia; cansaço fácil após exercícios; diminui a frequência à escola	Tosse ocasional; FR levemente aumentada; médio enfisema; discreto baqueteamento de dedos	Peso e altura acima do p3; fezes anormais, pouco formadas; distensão abdominal; hipotrofia muscular	Enfisema de média intensidade; aumento da trama vasobrônquica
Moderado (41-55)	10	Dispnéia após pequenas caminhadas; repouso em grande parte do dia	Tosse frequente produtiva; retração torácica; enfisema moderado; baqueteamento 2 a 3 +	Peso e altura abaixo do p3; fezes anormais; volumosa redução da massa muscular	Moderado enfisema; áreas de atelectasia; áreas de infecção discreta; bronquiectasias
Grave (40 ou menos)	05	Ortopnéia; confinado ao leito	Tosse intensa; períodos de taquipnéia e taquicardia; extensas alterações pulmonares; sinais de falência cardíaca direita; baqueteamento 3 a 4 +	Desnutrição intensa; distensão abdominal; prolapso retal	Extensas alterações; fenômenos obstrutivos; infecção; atelectasia; bronquiectasias

ANEXO C: Características dos pacientes no início da infecção pelo complexo *B. cepacia*.

Iniciais do paciente	Idade	Sexo	IMC (kg/ m ²)	Mutação Delta F508	Colonização por <i>P.aeruginosa</i>	Escore	VEF1 (% previsto)
BP	11a5m	Fem	16,9	Homozigoto	Intermitente	85	82
BMP	1a9m	Fem	13,7	NP	Não	70	NR
CAP	15a4m	Fem	12,6	Heterozigoto	Crônica	40	26
CCN	2a2m	Fem	12,6	Heterozigoto	Intermitente	55	NR
CHT	10a11m	Masc	12,1	Homozigoto	Intermitente	45	47
DCSS	17a4m	Fem	15,9	Heterozigoto	Crônica mucóide	50	47
ESN	12a11m	Masc	15,7	Desconhecida	Crônica	55	51
FAS	13a1m	Masc	16	NP	Intermitente	60	120
GAS	7a6m	Masc	12,5	Desconhecida	Intermitente	60	46
IHP	12a8m	Masc	17,3	Heterozigoto	Não	85	92
LS	6a4m	Masc	14	Homozigoto	Crônica mucóide	55	58
LBA	11a10m	Masc	16,6	Homozigoto	Intermitente	70	83
LRN	13a10m	Masc	16,8	Heterozigoto	Crônica mucóide	90	67
LFS	15a6m	Fem	17	Homozigoto	Crônica mucóide	60	75
LSMB	7a5m	Fem	14,3	Homozigoto	Intermitente	50	66
OLC	11a3m	Masc	11,6	Homozigoto	Crônica	45	67
PBS	2a11m	Fem	15,8	Desconhecida	Crônica mucóide	60	NR
PCS	14a5m	Masc	15,4	Heterozigoto	Crônica mucóide	NR	27
RCO	9a2m	Masc	12,8	Heterozigoto	Crônica mucóide	55	45
VRFS	11m	Fem	12,9	NP	Não	60	NR
WRM	17a4m	Masc	18,3	Heterozigoto	Crônica	65	28

NP: não pesquisada

NR: não realizada

ANEXO D: Protocolo para extração do DNA das suspensões de cepas do complexo *B. cepacia* isoladas nas amostras de escarro ou esfregaço de orofaringe.

1. Processamento inicial

- a. Centrifugar *full speed* por 10 minutos.
- b. Desprezar o sobrenadante com cuidado.

(em especial nas amostras com *pellets* pequenos)

2. Etapas enzimáticas

- a. Adicionar solução de Proteinase K, 500 µl/tubo → VORTEX
- b. Adicionar Proteinase K (25mg/ml), 20 µl/tubo → VORTEX
- c. Incubar a 56° C por 1 hora (VORTEX no meio da incubação).

3. Técnica de Fenol Clorofórmio

- a. Adicionar 500µl de Phenol Clorofórmio Isoamil Álcool → VORTEX.
- b. Centrifugar *full speed* a 4° C por 5 minutos.
- c. Transferir SOBRENADANTE para *eppendorf* já identificado.
- d. Adicionar uma parte de Phenol Clorofórmio Isoamil Álcool → VORTEX.
- e. Centrifugar *full speed* a 4° C por 5 minutos.
- f. Transferir SOBRENADANTE para outro *eppendorf* já identificado.
- g. Adicionar uma parte de Clorofórmio → VORTEX.

- h. Transferir SOBRENADANTE para outro *eppendorf* já identificado.
- i. Adicionar 0,1 parte de Acetato de Na e 2,5 partes de ETANOL 100% gelado.
- j. O DNA VAI PRECIPITAR!!!
- k. Coloque em freezer -20°C overnight ou a -70°C por 20 min.
- l. Centrifugar *full speed* por 5 minutos.
- m. Remover o etanol (CUIDADO COM O *PELLET*!). Pode-se lavar o *pellet* mais uma vez com etanol (repetir o item l, depois tirar o etanol).
- n. Deixar o *pellet* secar.

ANEXO E: Descrição das reações de PCR para identificação dos genômicos de cepas do complexo *B. cepacia* isoladas dos pacientes com fibrose cística.

As reações foram adaptadas a partir da descrição de Mahenthiralingam et al. (2000):

- 100 ng de DNA template
- 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8,0)
- dNTP's 250 µM (cada)
- MgCl₂ 1,5 mM
- 20 pmol de cada *primer*
- 1 unidade de Taq DNA polimerase
- 5 µl da solução Q (QUIAGEN) - solução utilizada para melhorar eficiência do PCR em amostras de DNA com alto conteúdo dos nucleotídeos guanina e citosina (GC).

Total da mistura: 25 µl

Todas as reações de PCR incluíram pelo menos um controle positivo (amostra de DNA de genômico conhecido do complexo *B. cepacia*) e um controle negativo (amostra sem adição de DNA). O protocolo abaixo foi utilizado no termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), sendo a temperatura de pareamento dos *primers* definida de acordo com suas características (QUADRO 3):

96° C 5 min

96° C 30 seg

T° C 45 seg

72° C 1 min

x 30

72° C 10 min

4° C soak

ANEXO F: Descrição das reações de PCR para identificação do gênero *Burkholderia*.

As reações foram realizadas conforme descrição de Payne et al. (2005):

- 100 ng de DNA template
- 1x PCR buffer (contendo 1,5 mM de MgCl₂)
- dNTP's 250 µM (cada)
- 10 pmol de cada *primer*
- 1 unidade de Taq DNA polimerase

Total da mistura: 25 µl

As reações também incluíram um controle positivo (amostra de DNA de cepa do complexo *B. cepacia*) e um controle negativo (amostra sem adição de DNA). O protocolo abaixo foi utilizado no termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf):

96° C 5 min

94° C 30 seg 60° C 30 seg 72° C 45 seg	}	x 30	→	72° C 10 min	→	4° C soak
---	---	-------------	----------	---------------------	----------	------------------

ANEXO G: Descrição das reações de PCR para identificação dos fatores de virulência (genes *cbIA* e *esmR*).

1. Reação para amplificação do gene *cbIA* realizada conforme descrição de Sajjan et al. (1995):

- 100 ng de DNA template
- 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8,0)
- dNTP's 250 μ M (cada)
- $MgCl_2$ 2 mM
- 100 pmol de cada *primer*
- 1 unidade de Taq DNA polimerase

Total da mistura: 25 μ l

O protocolo abaixo foi utilizado no termociclador:

2. Reação para amplificação do gene *esmR* realizada conforme descrição de Mahenthiralingam et al. (1997):

- 100 ng de DNA template

- 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8,0)
- dNTP's 250 μ M (cada)
- MgCl_2 2 mM
- 100 pmol de cada *primer*
- 1 unidade de Taq DNA polimerase

Total da mistura: 25 μ l

O protocolo abaixo foi utilizado no termociclador:

As reações incluíram um controle positivo (amostra de DNA de cepa do complexo *B. cepacia* sabidamente portadora dos genes de virulência – AU0355) e um controle negativo (amostra sem adição de DNA).

ANEXO H: Descrição das reações de RAPD para genotipagem das cepas do complexo *B. cepacia*.

As reações de RAPD foram realizadas conforme descrição de Mahenthiralingam et al. (1996):

- 40 ng de DNA template
- 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8,0)
- dNTP's 250 μ M (cada)
- $MgCl_2$ 3 mM
- 40 pmol do *primer* 272
- 1 unidade de Taq DNA polimerase

Total da mistura: 25 μ l

As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf, utilizando parâmetros de baixas temperaturas de pareamento, como descrito no protocolo de ciclagem abaixo:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Agodi A, Mahenthiralingam E, Barchitta M, Giannino V, Sciacca A, Stefani S. *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis: prevalence, epidemiology, and genomovar status. *J Clin Microbiol.* 2001;39(8):2891-6.
2. Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessei G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. *J Pediatr (Rio J).* 2004;80(5):371-9.
3. Aris RM, Routh JC, Lipuma JJ, Heat DG, Gilligan PH. Lung transplantation for cystic fibrosis patients with *Burkholderia cepacia* complex. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:2102-6.
4. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Roller C. Discrimination *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia vietnamiensis* from *Burkholderia cepacia* genomovars I, III and IV by PCR. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1335-9.
5. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Roller C. Discrimination of *Burkholderia gladioli* from other *Burkholderia* species detectable in cystic fibrosis patients by PCR. *J Clin Microbiol.* 1998;36(9):2748-51.
6. Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Chiarini L, Belli ML, Piana S, et al. *Burkholderia cepacia* complex bacteria from clinical and environmental sources in Italy: genomovar status and distribution of traits related to virulence and transmissibility. *J Clin Microbiol.*

2002;40(3):846-51.

7. Brisse S, Stefania S, Verhoef J, Van Belkum A, Vandamme P, Goessens W. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK2 automated instruments for identification of isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1743-8.
8. Burns JL, Saiman L. *Burkholderia cepacia* infections in cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J.* 1999;18(2):155-6.
9. Campana S, Taccetti G, Ravenni N, Favari F, Sciacca A, Savoia D, et al. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):5136-42.
10. Carvalho GM, Carvalho AP, Folescu TW, Higa L, Teixeira LM, Plotkowski MC, et al. Transient isolation of *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia* from a Brazilian cystic fibrosis patient chronically colonized with *Burkholderia vietnamiensis*. *J Cystic Fibrosis.* 2005;4:267-70.
11. Chaparro C, Maurer J, Gutierrez C, Krajden M, Chan C, Winton T, et al. Infection with *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: outcome following lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:43-8.
12. Clode FE, Kaufmann ME, Malnick H, Pitt TL. Distribution of genes encoding putative transmissibility factors among epidemic and nonepidemic strains of *Burkholderia cepacia* from cystic fibrosis patients in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1763-6.

13. Coenye T, Mahenthiralingam E, Henry D, LiPuma JJ, Laevens S, Gillis M et al. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001a;51:1481-90.
14. Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, Lipuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2001b;30(10):3427-36.
15. Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environm Microbiol.* 2003;5(9):719-29.
16. Courtney JM, Dunbar KEA, McDowell A, Moore JE, Warke TJ, Stevenson M, Elborn JS. Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. *J Cystic Fibrosis.* 2004;3:93-8.
17. Cunha MV, Leitão JH, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Lito L, Barreto C, et al. Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a portuguesees cystic fibrosis center: a 7-year study. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4113-20.
18. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2004.
19. Detsika MG, Corkill JE, Magalhães M, Glendinning KJ, Hart CA, Winstanley C. Molecular typing of, and distribution of genetic markers among *Burkholderia cepacia* complex isolates from Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4148-53.
20. Frangolias DD, Mahenthiralingam E, Rae S, Raboud JM, Davidson

- AG, Wittmann R, et al. *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1572-7.
21. Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1997;23(5):330-5.
22. Govan JR, Brown PH, Maddison J, Doherty CJ, Nelson JW, Dodd M et al. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet*. 1993;342(8862):15-9.
23. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*. 1996;60(3):539-74.
24. Henry DA, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Coeney T, Speert DP. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol*. 2001;39(3):1073-8.
25. Hudson VL, Wielinski CL, Regelman WE. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *J Pediatr*. 1993;122(6):854-60.
26. Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, et al. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr*. 1984;104(2):206-10.
27. Johansen HK, Kovesi TA, Koch C, Corey M, Hoiby N, Levison H. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* infection in

- cystic fibrosis patients treated in Toronto and Copenhagen. *Pediatr Pulmonol.* 1998;26(2):89-96.
28. Jones AM, Dodd ME, Govan JRW, Barcus V, Doherty CJ, Morris J, Webb AK. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax.* 2004;59:948-51.
29. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature.* 1989; 339:237-8.
30. LiPuma JJ, Dulaney BJ, McMenamin JD, Whitby PW, Stull TL, Coenye T et al. Development of rRNA-based PCR assays for identification of *Burkholderia cepacia* complex isolates recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 1999;37(10):3167-70.
31. Lipuma JJ, Spilker T, Gill LH, Campbell PW, Liu L, Mahenthiralingam E. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:92-6.
32. LiPuma JJ. Update on the *Burkholderia cepacia* complex. *Curr Opin Pulm Med.* 2005;11:528-33.
33. Lloyd AT, Sharp PM. Evolution of the recA gene and the molecular phylogeny of bacteria. *J Mol Evol.* 1993;37:399-407.
34. Magalhaes M, Doherty C, Govan JR, Vandamme P. Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. *J Hosp Infect.* 2003;54(2):120-3.
35. Mahenthiralingam E, Baldwin A, Vandamme P. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.*

2002;51:533-8.

36. Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y et al. DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3165-73.
37. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert D. Random Amplified Polymorphic DNA Typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1996a;34(5):1129-35.
38. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Henry DA, Speert DP. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 1996b;34(12):2914-20.
39. Mahenthiralingam E, Simpson DA, Speert DP. Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic *Burkholderia cepacia* strains recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1997;35(4):808-16.
40. Manno G, Dalmastri C, Tabacchioni S, Vandamme P, Lorini R, Minicucci L, et al. Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different *Burkholderia cenocepacia* strains, among patients attending an Italian cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol.* 2004;42(4):1491-7.
41. Marques E, Pinto RM, Dallallana LT, et al. Isolation of *Pseudomonas*

- cepacia* in cystic fibrosis patient. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993;88:125-9.
42. Martin DW, Mohr CD. Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun*. 2000;68(1):24-9.
43. McDowell A, Mahenthiralingam E, Dunbar KEA, Moore JE, Crowe M, Elborn JS. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation. *J Med Microbiol*. 2004;53:663-8.
44. McMenamin JD, Zacccone TM, Coeney T, Vandamme P, LiPuma JJ. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers: an analysis of 1,051 recent sputum isolates. *Chest*. 2000;117(6):1661-5.
45. Monte LFV. Detecção da *Staphylococcus aureus* resistente à metilina por meio de *multiplex* PCR em amostras de secreção respiratória de pacientes com fibrose cística [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2005.
46. Moore JE, Millar BC, Jiru X, McCappin J, Crowe M, Elborn JS. Rapid characterization of the genomovars of the *Burkholderia cepacia* complex by PCR-single-stranded conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis. *J Hosp Infect*. 2001;48(2):129-34.
47. Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Robertson CF et al. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2001;138(5):699-704.
48. Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, LiPuma JJ, Coenye T,

- Weightman AJ, et al. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(7):3917-27.
49. Pegues DA, Carson LA, Tablan OC, FitzSimmons SC, Roman SB, Miller JM, et al. Acquisition of *Pseudomonas cepacia* at summer camps for patients with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 1994;124(1):694-702.
50. Pegues DA, Schidlow DV, Tablan OC, Carson LA, Clark NC, Jarvis WR. Possível transmissão nosocomial de *Pseudomonas cepacia* em pacientes com fibrose cística. *Jama.* 1995;2:583-92.
51. Polgar G, Promadhat V. Pulmonary function testing in children: techniques and standards. Philadelphia, PA: Saunders, 1971.
52. Polgar G, Weng T. The function development of the respiratory system from the period of gestation to adulthood. *Am Rev Respir Dis.* 1979;120:625-95.
53. Ramsey BW. Management of pulmonary disease in patient with cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1996;335(3):179-88.
54. Raskin S, Phillips JA, III, Krishnamani MR, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T et al. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet.* 1993;46(6):665-9.
55. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003;361:681-9.
56. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel.

- J Pediatr.* 1998;132(4):589-95.
57. Rosenstein BJ, Hall DE. Pneumonia and septicemia due to *Pseudomonas cepacia* in a patient with cystic fibrosis. *Johns Hopkins Med J.* 1980;147(5):188-9.
58. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Mechanisms of disease cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2005;352:1992-2001.
59. Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:57-71.
60. Sajjan US, Sun L, Goldstein R, Forstein JF. Cable (cbl) type II pili of cystic fibrosis - associated *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: nucleotide sequence of the *cbIA* major subunit pilin gene and novel morphology of assembled appendage fibers. *J Bacteriol.* 1995;177(4):1030-8.
61. Sambrook J, Fritz E, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. 1989.
62. Segonds C, Bingen E, Couetdic G, Mathy S, Brahim N, Marty N, et al. Genotypic analysis of *Burkholderia cepacia* isolates from 13 French cystic fibrosis centers. *J Clin Microbiol.* 1997;35(8):2055-60.
63. Shelly DB, Spilker T, Gracely EJ, Coenye T, Vandamme P, Lipuma JJ. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J Clin Microbiol.* 2000;38(8):3112-5.
64. Shreve MR, Butler S, Kaplowitz HJ, Rabin HR, Stokes D, Light M et al. Impact of microbiology practice on cumulative prevalence of

- respiratory tract bacteria in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(3):753-7.
65. Silva Filho LV, Levi JE, Bento CE, Rodrigues JC, da Silva Ramos SR. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis outpatient clinic. *J Med Microbiol.* 2001;50(3):261-7.
66. Silva Filho LV, Levi JE, Oda Bento CN, da Silva Ramos SR, Rozov T. PCR identification of *Pseudomonas aeruginosa* and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol.* 1999;48(4):357-61.
67. Silva Filho LV, Velloso LF, Bento CN, Gytin E, Tateno AF, Levi JE et al. Use of selective medium for *Burkholderia cepacia* isolation in respiratory samples from cystic fibrosis patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002;44(4):203-8.
68. Smith DL, Gumery LB, Smith EG, Stableforth DE, Kaufmann ME, Pitt TL. Epidemic of *Pseudomonas cepacia* in an adult cystic fibrosis unit: evidence of person-to-person transmission. *J Clin Microbiol.* 1993;31(11):3017-22.
69. Smith KC, Wangh TC. *recA*-dependent DNA repair processes. *Biossays.* 1989;10:12-6.
70. Souza AV, Moreira CR, Pasternak J, Hirata ML, Saltini DA, Caetano VC, et al. Characterizing uncommon *Burkholderia cepacia* complex isolates from an outbreak in a haemodialysis unit. *J Med Microbiol.* 2004; 53: 999–1005.
71. Speert DP, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthiralingam E.

- Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canadá. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(2):181-7.
72. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray, BE, Persing DH et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233-9.
73. Valerius NH, Koch C, Hoiby N. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet.* 1991;338(8769):725-6.
74. van Pelt C, Verdiun CM, Goessens WH, Vos MC, Tummler B, Segonds C et al. Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. *J Clin Microbiol.* 1999;37(7):2158-64.
75. Vandamme P, Henry D, Coenye T, Nzula S, Vancannety M, LiPuma JJ et al. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;33(2):143-9.
76. Vandamme P, Holmes B, Vancannety M, Coenye T, Hoste B, Coopman R et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(4):1188-1200.
77. Vazquez C, Municio M, Corera M, Gaztelurrutia L, Sojo A, Vitoria JC.

- Early treatment of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis. *Acta Paediatr.* 1993;82(3):308-9.
78. Vermis K, Coenye T, LiPuma JJ, Mahenthiralingam E, Nelis HJ, Vandamme P. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:689-91.
79. Vermis K, Coenye T, Mahenthiralingam E, Nelis HJ, Vandamme P. Evaluation of species-specific *recA* – based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. *J Med Microbiol.* 2002;51:937-40.
80. Walters S, Smith EG. *Pseudomonas cepacia* in cystic fibrosis: transmissibility and its implications. *Lancet.* 1993;342:3-4.
81. Whitby PW, Cater KB, Hatter KL, LiPuma JJ, Stull TL. Identification of members of the *Burkholderia cepacia* complex by species-specific PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38(8):2962-5.
82. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol.* 1992;36(12):1251-75.
83. Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet.* 1995;29:777-807.